

# Etablierung und Evaluierung eines Capture-ELISAs zum Nachweis des Beta2-Toxins von *Clostridium perfringens* aus Feldisolaten

---

**ALEXA SOMMER**



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. em. G. Baljer

**Etablierung und Evaluierung eines Capture-ELISAs**  
**zum Nachweis des Beta2-Toxins von**  
***Clostridium perfringens* aus Feldisolaten**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Alexa Sommer**  
Tierärztin aus Paderborn

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. em. G. Baljer  
Prof. Dr. Kornelia Ziegler

Tag der Disputation: 27.05.2015

Meinen Eltern in Liebe

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Alexa Sommer

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Clostridium perfringens</i> Beta2-Toxin .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Inaktivierung und Degradation des Beta2-Toxins .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3</b>	<b>Die Beta2-Toxin-Varianten.....</b>	<b>4</b>
<b>2.4</b>	<b>Die Regulation der Beta2-Toxin-Expression.....</b>	<b>6</b>
<b>2.5</b>	<b>Zur Frage der pathogenetischen Bedeutung des Beta2-Toxins .....</b>	<b>8</b>
<b>2.6</b>	<b>Die toxische Wirkung des Beta2-Toxins.....</b>	<b>10</b>
<b>2.7</b>	<b>Der Nachweis von Beta2-Toxin bzw. seines Gens <i>cpb2</i>.....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Verwendete Bakterienstämme .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Anzucht der Bakterienstämme.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Ammoniumsulfatfällung .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b>Dialyse.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5</b>	<b>Proteinbestimmung .....</b>	<b>19</b>
<b>3.6</b>	<b>Herstellung des rekombinanten Beta2-Toxins in <i>E.coli</i>.....</b>	<b>20</b>
3.6.1	Anzucht des TOP10F`pHIT-VIc-40 .....	20
3.6.2	Expression und Induktion.....	20
3.6.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung des rekombinanten Beta2-Toxins.....	21
<b>3.7</b>	<b>Herstellung von polyklonalem Anti-Beta2-Serum in der Maus und im Kaninchen.....</b>	<b>21</b>
3.7.1	Tierversuche.....	21
3.7.2	Versuchstiere .....	22
3.7.3	Impfantigen.....	22
3.7.4	Impfschemata .....	22
3.7.5	Serumgewinnung.....	22

<b>3.8</b>	<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</b> .....	<b>23</b>
<b>3.9</b>	<b>Immunoblotverfahren</b> .....	<b>24</b>
<b>3.10</b>	<b>Herstellung monoklonaler Antikörper</b> .....	<b>25</b>
3.10.1	Versuchstiere .....	25
3.10.2	Impfschema .....	25
3.10.3	Präparation muriner Peritonealmakrophagen .....	26
3.10.4	Myelomzelllinie und Fusionstechnik .....	27
3.10.5	ELISA zum Nachweis Beta2-Toxin-Antikörper produzierender Hybridomazellen.....	29
3.10.6	Klonierung.....	29
3.10.7	Massenproduktion der monoklonalen Antikörper .....	30
3.10.8	Subklassenbestimmung .....	30
3.10.9	Aufreinigung der monoklonalen Antikörper mittels .....	30
	Protein G-Sepharose	
3.10.10	ELISA zum Nachweis von Maus-Immunglobulinen der Klasse.....	31
	IgG	
<b>3.11</b>	<b>Titration der Antikörper und des Antigens</b> .....	<b>32</b>
3.11.1	Fangantikörper (Beta2-spezifische mAk 2-4A5 und 2-4C11) .....	32
3.11.2	Nachweisantikörper (Beta2-spezifisches polyklonales Serum vom Kaninchen)....	32
3.11.3	Rekombinanten Beta2-Toxin.....	33
<b>3.12</b>	<b>Kompetitiver Epitop-ELISA</b> .....	<b>33</b>
<b>3.13</b>	<b>Anionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung des Beta2-Toxins</b> .....	<b>34</b>
<b>3.14</b>	<b>Immunomagnetische Protein-Isolation</b> .....	<b>35</b>
<b>3.15</b>	<b>Methoden zur Untersuchung der biologischen Aktivität des Beta2-Toxins von <i>C. perfringens</i></b> .....	<b>36</b>
3.15.1	In-vitro-Testverfahren .....	36
3.15.1.1	Eigelbagar-Diffusions-Trübungstest .....	36
3.15.1.2	Zellkulturtest.....	36
3.15.2	In-vivo-Testverfahren.....	39
3.15.2.1	Tierversuche .....	39
<b>3.16</b>	<b>Hämolyseversuche</b> .....	<b>39</b>
3.16.1	Gewinnung von Kaninchenerythrozyten .....	39



3.16.2	Präparation von Erythrozytenmembranfragmenten mittels fraktionierter Zentrifugation.....	40
3.16.3	Untersuchung zur hämolytischen Wirkung eines Alphatoxin Beta2-Toxin-Gemisches an Kaninchen– und Ferkelerythrozyten.....	40
3.16.4	Untersuchung zur hämolytischen Wirkung des Alphatoxin-Beta2-Toxin Gemisches nach Präinkubation mit dem mAk 2-4C11.....	40
3.16.5	Untersuchung zur hämolytischen Wirkung eines Beta2- positiven <i>C. perfringens</i> Typ A-Feldisolates nach Präinkubation mit dem mAk 2-4C11.....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Nachweis der Bindungsreaktion des Beta2-spezifischen Hyperimmunserums gegenüber dem rBeta2-Toxin im Immunoblot.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Nachweis der fraktionierten Elution des Beta2-Toxins in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....</b>	<b>44</b>
<b>4.3</b>	<b>Nachweis des nativen Beta2-Toxins in <i>C. perfringens</i>- Kulturüberständen mittels Beta2-spezifischen polyklonalen Serums von der Maus.....</b>	<b>45</b>
4.3.1	Prozentuale Verteilung Beta2-positiver Typ A- und Typ C –Kulturüberstände von Beta2-Toxingen-positiven Isolaten.....	46
4.3.2	Quantitative Bestimmung der Toxinbildung des Beta2-Toxins aus <i>C. perfringens</i> Kulturüberständen im Immunoblot.....	46
<b>4.4</b>	<b>Bestimmung Beta2-spezifischer Antikörper im Kaninchenserum .....</b>	<b>48</b>
4.4.1	Optimale Menge des Nachweisantikörpers (Beta2-spezifisches Serum vom Kaninchen) im Capture ELISA.....	49
<b>4.5</b>	<b>Charakterisierung der monoklonalen Antikörper .....</b>	<b>50</b>
4.5.1	Epitopspezifität, Immunglobulinsubklassen und Reinheitsgrad .....	50
<b>4.6</b>	<b>Etablierung des Beta2-spezifischen Capture-ELISAs .....</b>	<b>52</b>
4.6.1	Bestimmung der optimalen Konzentration des Fangantikörpers.....	52
4.6.2	Nachweisgrenze der monoklonalen Antikörper 2-4A5 und 2-4C11 auf Nunc-Maxisorp-Platten® .....	54
4.6.3	Aufbau des Beta2-spezifischen Capture-ELISAs .....	55

4.6.4	Nachweisgrenze für das rekombinante Beta2-Toxin im Capture ELISA.....	58
4.6.5	Intra-Assay-Präzision.....	59
4.6.6	Inter-Assay-Präzision.....	60
4.6.7	Sensitivität des Capture-ELISAs.....	62
4.6.8	Spezifität des Capture-ELISAs.....	63
4.6.9	Untersuchung von <i>C. perfringens</i> -Kulturüberständen aus Kotproben von gesunden und kranken Saugferkeln mittels Beta2-spezifischen Capture-ELISAs.....	64
<b>4.7</b>	<b>Gewinnung von nativem Beta2-Toxin aus <i>C. perfringens</i>- Kulturüberständen.....</b>	<b>67</b>
4.7.1	Isolierung des nativen Beta2-Toxins mittels..... Anionenaustauschchromatographie.....	67
4.7.2	Immunomagnetische Beta2-Toxinaufreinigung mittels Dynabeads.....	69
<b>4.8</b>	<b>Ergebnisse zur biologischen Aktivität des rekombinanten und nativen Beta2-Toxins von <i>C. perfringens</i>.....</b>	<b>70</b>
4.8.1	Nachweis der enzymatischen Aktivität des rekombinanten Beta2-Toxins.....	70
4.8.2	Zytotoxische Wirkung des rekombinanten Beta2-Toxins für verschiedene Zelllinien.....	71
4.8.3	Zytotoxische Wirkung des nativen Beta2-Toxins in verschiedenen Zelllinien.....	71
4.8.4	Nachweis der hämolytischen Aktivität des Alphatoxin von <i>C. perfringens</i> nach Zugabe von rBeta2-Toxin.....	75
4.8.5	Nachweis der hämolytischen Wirkung von Alphatoxin- und Beta2-Toxin-positiven <i>C. perfringens</i> -Kulturüberstand nach Präinkubation mit dem mAk 2-4C11.....	77
4.8.6	Nachweis der hämolytischen Wirkung des Alphatoxins- und rBeta2-Toxins nach Präinkubation mit dem mAk 2-4C11.....	78
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>87</b>

<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>96</b>
<b>9.1</b>	<b>Chemikalien .....</b>	<b>96</b>
<b>9.2</b>	<b>Antikörperkonjugate.....</b>	<b>96</b>
<b>9.3</b>	<b>Plasmide.....</b>	<b>96</b>
<b>9.4</b>	<b>Versuchstiere.....</b>	<b>96</b>
<b>9.5</b>	<b>Kulturmedien.....</b>	<b>96</b>
<b>9.6</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>98</b>
9.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese Puffer.....	98
9.6.2	Puffer für den Elektrotransfer mittels Western-Blot-Verfahren.....	99
9.6.3	Puffer und Lösungen für den Immunoblot .....	99
9.6.4	Puffer für die Induktion, Expression und Aufreinigung des Beta2-Toxins.....	100
9.6.5	Puffer und Lösungen für den ELISA.....	101
9.6.6	Puffer für Hämolyseversuche .....	102
9.6.7	Puffer und Lösungen für Zellkulturtechniken .....	102
<b>9.7</b>	<b>Injektionsnarkotikum .....</b>	<b>103</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
AAD	Antibiotika-assoziierte Diarrhoe
A.bidest	Aqua bidestillata
Abb	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinobis (3-ethylbenzthiazolinesulfinic Acid)
APS	Ammoniumpersulfa
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparagin
ATCC	American Type Culture Collection
Best.-Nr.	Bestell-Nummer
$\beta$	Beta
BLM	Bilayer-Lipid-Membran
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Clostridium</i>
Ca	Calcium
ca.	circa
CHO	Chinese Hamster Ovary (cells)
Cl	Chlorid
<i>cpb1</i>	<i>C. perfringens</i> Beta- Toxigen
<i>cpb2</i>	<i>C. perfringens</i> Beta2-Toxigen
<i>cpe</i>	<i>C. perfringens</i> Enterotoxin
CPMI	<i>C. perfringens</i> -Medium 1
Cys	Cystein
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRM	Detergenz-resistenten Membranmikrodomänen
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
$\epsilon$	Epsilon
EDC	Glycinmethylester
EBA	Enothel-Barrier-Antigen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFA	Ethoxyforminanhidrid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMF	Erythrozytenmembranproteine
<i>etx</i>	<i>C. perfringens</i> Epsilon-Toxin
FCS	Fetal calf serum
Fa.	Firma
FPLC <sup>®</sup>	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
G-402	Human caucasian renal leiomyoblastoma cells
GB	Großbritannien
GST	Glutathion S- Transferase
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxylsäure
HBE	Human bronchial epithelial cells
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HL60-Zellen	Humane Leukämie Zellen

## Abkürzungsverzeichnis

HRPT	Human renal proximal tubule cells
HSAE	Human small airways epithelial cells
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
HWP	Hypotoner Waschpuffer
ι	Iota
IDT	Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH
Ig	Immunglobulin
Ile	Isoleucin
IP	Isoelektrischer Punkt
i.p.	intraperitoneal
IS	Insertionselement
i.v.	intravenös
IWP	Isotoner Waschpuffer
K	Kalium
KE	Kaninchenerythrozyten
kDa	Kilodalton
kg	kilogramm
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LC	Mittlere Lebensfähigkeit
LD	Letale Dosis
log	Logarithmus
Lys	Lysin
M	Molar
m	Milli
mAk	Monoklonaler Antikörper
MDCK	Madin-Darby-canine kidney-cells
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
n	nano
Na	Natrium
NAI	N-Acetylimidazol
NBS	N-Bromsuccinimid
NCTC	National collection of type cultures
nß2	natives Beta2-Toxin
NC	Nitrocellulose
NE	Nekrotisierende Enteritis
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	polyklonale Antikörper
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentia Hydrogenii
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rß2	rekombinantes Beta2-Toxin
RT	Raumtemperatur

## Abkürzungsverzeichnis

SA	Succinicanhydrid
s.c.	subcutan
<i>Sc.</i>	<i>Streptococcus</i>
SD	sporadische Diarrhoe
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
<i>Staph.</i>	<i>Staphylococcus</i>
Tab	Tabelle
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzen Sulfonsäure
TNM	Tetranitromethan
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
VCO	Vasogenes-cerebrales Ödem
WBA	whole-body autoradiography
U/min	Umdrehungen pro Minute
μ	Mikro

## 1 Einleitung

*Clostridium (C.) perfringens*, ein ubiquitär vorkommendes Bakterium, führt bei vielen Haus- und Nutztierarten zu Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes.

Bedeutendste Erkrankung, vor allem unter wirtschaftlichem Aspekt, ist die nekrotisierende Enteritis (NE) der Saugferkel, hervorgerufen durch *C. perfringens* Typ C. Hauptvirulenzfaktor ist das *C. perfringens* Beta-Toxin. Im klinischen Bild zeigen die Tiere blutigen Durchfall mit hoher Morbidität und Mortalität. Pathologisch-anatomisch findet man im Dünndarm hämorrhagische Nekrosen, mit Destruktionen im Mikrovillisaum (Johannsen et al., 1986).

1997 wurde erstmals bei einem Saugferkel, das an einer nekrotisierenden Enteritis erkrankt war, ein neues Toxin isoliert, das Beta2-Toxin. Dieses Toxin zeigt keine signifikante Homologie zum Beta-Toxin, induziert jedoch im ileal-loop-test am Kalb wie das Beta-Toxin hämorrhagische Nekrosen (Gibert et al., 1997). Seit seiner Entdeckung wird versucht, die Bedeutung des Beta2-Toxins als Virulenzfaktor in der Pathogenese der NE der Saugferkel zu klären. Erste Studien hierzu konzentrierten sich auf die genotypische Untersuchung von *C. perfringens*-Stämmen. So steht zum Zeitpunkt der Fragestellung der Nachweis des Beta2-Toxingens nur mittels PCR als einziges etabliertes System zur Verfügung und lässt keine Aussage über eine mögliche Toxinexpression zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels selbst hergestellter monoklonaler-Beta2-spezifischer Antikörper ein sensitives und spezifisches phänotypisches Verfahren zu entwickeln. Mit der Etablierung und Evaluierung eines Beta2-toxinspezifischen ELISAs sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Wird grundsätzlich bei Beta2-Toxingen-positiven *C. perfringens*-Isolaten das korrespondierende Beta2-Toxin in den Kulturüberstand exprimiert?
- Kann ein Unterschied im Expressionslevel bei Isolaten aus Kotproben gesunder und kranker Saugferkel gefunden werden?
- Lassen sich somit Rückschlüsse auf die Beteiligung des Beta2-Toxins in der Pathogenese der NE gewinnen?

## 2 Schrifttum

### 2.1 *C. perfringens* Beta2-Toxin

Die Pathogenität von *Clostridium perfringens*, einem grampositiven Erreger, der Enteritiden, Enterotoxämien und Gasödemerkrankungen bei Haus- und Wildtierspezies sowie auch beim Menschen hervorruft, beruht auf seiner Fähigkeit zahlreiche, teilweise hochpotente Toxine (Majortoxine) zu bilden (van Asten, Nikolaou et al. 2010). Neben den vier Majortoxinen Alpha, Beta, Epsilon und Iota, die zur Einteilung in die Toxovaren (Synonym Typen) A-E herangezogen werden, sind mehr als 13 Minortoxine bekannt (Hatheway 1990; Rood and Cole 1991; Songer 1996).

1997 wurde mit dem Beta2-Toxin ein weiteres Minortoxin von *C. perfringens* beschrieben (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997). Es handelt sich um ein 265-Aminosäuren (AS) umfassendes Protein (26670 Da) mit einem isoelektrischen Punkt von 5,01 (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997). Eine Signalsequenz (30 AS) wird bei der Ausschleusung aus dem Zytoplasma abgespalten (Bueschel, Jost et al. 2003; Heydel 2010). Das Beta2-Gen (*cpb2*) ist plasmidkodiert. Es wurde auf Plasmiden unterschiedlicher Größe (meist ~50 kb) und auf diesen an unterschiedlichen *loci* nachgewiesen (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997; Shimizu, Ohtani et al. 2002; Waters, Savoie et al. 2003; Waters, Raju et al. 2005; Fisher 2006; Gurjar, Li et al. 2010). Hierbei scheint es Abhängigkeiten zwischen dem Wirt, dem Krankheitsbild, der Beta2-Variante (2.3) und der Plasmidgröße bzw. der zusätzlich vorhandenen Gene zu geben. Beispielsweise konnte Fisher die Beta2-Toxin-Variante CPB2h2 stets auf einem ~50 kb Plasmid, CPB2h1 hingegen auf einem ~75 kb-Plasmid nachweisen (Fisher 2006).

Beta2-Toxin hat weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäure-Ebene Ähnlichkeit mit anderen bekannten Proteinen (Nukleotid- bzw. Proteindatenbank, (Altschul, Gish et al. 1990). Auch zum Beta-Toxin besteht, trotz des Namens, keine Verwandtschaft. Das Beta2-Toxin weist zum Beta-Toxin lediglich eine Nukleotidsequenzhomologie von 15 % auf. In einer Studie wird eine schwache „immunologische Verwandtschaft“ der beiden Toxine proklamiert, da Anti-Beta2-Antikörper (im Gegensatz zu Anti-Beta-Antikörpern) beide Toxine detektieren konnten (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997). Allerdings wurden diese Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt und konnten in hauseigenen Untersuchungen nicht nachvollzogen werden (Ergebnisse nicht publiziert), was die Vermutung nahelegt, dass versehentlich ein Toxingemisch untersucht wurde. Ähnlichkeiten zwischen Beta- und Beta2-Toxin bestehen hinsichtlich der experimentell ermittelten Größen (28 kDA und 35 kDA),



isoelektrischen Punkte (5,6 und 5,4-5,5) und toxischen Eigenschaften im Mausversuch (Jolivet-Reynaud, Popoff et al. 1986). Das gleichzeitige Vorkommen in *C. perfringens* Typ C-Kulturüberständen führte dazu, dass für Untersuchungen zum Beta-Toxin irrtümlich Beta2-Toxin gewonnen wurde (Jolivet-Reynaud, Popoff et al. 1986), was die spätere Namensgebung (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997) beeinflusste.

## **2.2 Inaktivierung und Degradation des Beta2-Toxins**

Beta2-Toxin reagiert empfindlich auf Hitze und Oxidation (Jolivet-Reynaud, Popoff et al. 1986; Vilei, Schlatter et al. 2005; Fisher 2006). Bereits bei Temperaturen von 37 °C wird *in vitro* ein rascher Abfall der Toxizität beobachtet (Fisher 2006). Auch vermeintlich schonende Aufreinigungsschritte können bereits zur vollständigen Inaktivierung führen (Vilei, Schlatter et al. 2005). Zudem war es mehreren Arbeitsgruppen gar nicht erst möglich ein biologisch aktives Beta2-Toxin insbesondere in heterologen Expressionssystemen zu gewinnen (Heydel 2010). Die Prozesse, die in diesem Zusammenhang zur Inaktivierung führen, sind bislang nicht geklärt. Zwei konservierte Cysteine (Aminosäuren 154 und 264) scheinen die Oxidationsempfindlichkeit zumindest nicht zu bedingen, da reduzierende Substanzen die Inaktivierung nicht verhindern können (Fisher 2006).

Insbesondere im Hinblick auf die in dieser Arbeit etablierte ELISA-Methode zum Nachweis des Beta2-Toxins ist entscheidend, ob das Toxin durch die Inaktivierung seine antigenen Eigenschaften einbüßt und so dem Detektionssystem entgeht. Auch wenn der Inaktivierungsmechanismus ungeklärt ist wurde belegt, dass inaktives und aktives Beta2-Toxin vergleichbare antigene Eigenschaften besitzen und durch die gleichen polyklonalen Antikörper in Western-Blot-Untersuchungen nachgewiesen werden können (Jost, Billington et al. 2005). Auch die in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen Anti-Beta2-Antikörper (Seren von mit inaktivem, rekombinantem Beta2-Toxin geimpften Kaninchen) sind in der Lage, das native Beta2-Toxin aus *C. perfringens*-Kulturüberständen zu binden (Heydel 2010).

Neben einer Inaktivierung durch Denaturierungsprozesse oder chemische Modifikationen können Degradationsprozesse die Detektierbarkeit des Beta2-Toxins beeinflussen. Das Protein ist hochempfindlich gegenüber Trypsin. Bei Konzentrationen von 16 ng/ml wird es rasch inaktiviert (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997). Zunächst wird ein 24 kDa-Fragment gebildet, welches dann in zwei Fragmente von 13 und 15 kDa gespalten wird (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997; Fisher 2006). Die Degradierung führt zur Zerstörung von Epitopen. Lediglich eins der beiden Segmente wird von polyklonalen Anti-Beta2-Antikörpern vom

Kaninchen gebunden (Fisher 2006). Bei fortgesetzter Inkubation mit Trypsin werden beide Toxine in immer kleinere, nicht mehr im Western-Blot darstellbare Bruchstücke segmentiert. Hierdurch kann *in vivo* vermutlich nur im oberen Verdauungstrakt Beta2-Toxin detektiert werden, wie Dennison et al. mit einem ELISA-System in Untersuchungen am Verdauungstrakt von Rindern zeigten (Dennison, Van Metre et al. 2005).

Mittels Sequenzanalyse konnte nachgewiesen werden, dass Beta2-Toxin etwa alle 13 Aminosäuren eine potentielle Schnittstelle für Trypsin besitzt, wodurch es deutlich empfindlicher ist als beispielsweise Entero- oder Epsilon-Toxin von *C. perfringens*, die zudem erst durch Trypsineinwirkung aktiviert werden (Fisher 2006). Lediglich Beta-Toxin scheint ähnlich empfindlich, was insofern irritiert, als beide Toxine ins Darmlumen exprimiert werden und hier ihre Wirkung entfalten (Sakurai and Duncan 1978). Eventuell erklärt die Trypsinempfindlichkeit, warum gerade Ferkel, die über die Sauenmilch Trypsininhibitoren aufnehmen, an Nekrotisierender Enteritis und *C. perfringens* Typ A-Diarrhoe erkranken.

### **2.3 Die Beta2-Toxin-Varianten**

Für die Sensitivität eines Beta2-Toxin-ELISAs ist entscheidend, dass die Beta2-Sequenzen toxinbildender Isolate möglichst konserviert vorliegen. Eine Varianz in der Aminosäureabfolge kann Epitope direkt verändern oder ihre Exposition durch Beeinflussung von Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen verhindern. Die Sequenz des Beta2-Toxins ist nicht so konserviert wie die anderer *C. perfringens*-Toxine. Während beispielsweise Entero-, Theta-, Beta-, Iota-, Epsilon- und Alpha-Toxin zu über 98 % identisch sind (Fisher 2006) konnten Jost et al. zwei Beta2-Varianten unterscheiden (Jost, Billington et al. 2005). Die Konsensus-Variante (GenBank L77965), die der Sequenz der Erstbeschreibung entspricht, wird überwiegend für Isolate von durchfallkranken Ferkeln und Kälbern nachgewiesen (Jost, Billington et al. 2005; Lebrun, Filee et al. 2007). Die AS-Sequenz der atypischen Variante (GenBank AY609161) ist nur zu 62,3 % identisch und zu 80,4 % ähnlich (Jost, Billington et al. 2005). Sie wird vermehrt bei adulten Schweinen und Rindern, sowie bei anderen Tieren gefunden (Jost, Billington et al. 2005). Auch menschliche Isolate konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden, die in etwa mit den tierischen korrelieren, ohne ihnen aber vollständig zu entsprechen. Fisher benannte dem atypischen Beta2 ähnelnde Sequenzen (~97 % identisch, ~96% ähnlich), die er in Isolaten von an Antibiotika-assoziierte Diarrhoe (AAD) und sporadischer Diarrhoe (SD) erkrankten Patienten gewonnen hatte, CPB2h1 (h für *Human*). CPB2h2 entspricht eher (92% identisch, 90% ähnlich) dem Konsensus-Beta2-Toxin und

wurde in humanen Isolaten aus Lebensmittelvergiftungen detektiert (Fisher, Miyamoto et al. 2005). Hinsichtlich ihrer toxischen Eigenschaften scheinen sich die Varianten zu unterscheiden. Für Caco-2-Zellen war die TCD<sub>50</sub> (Toxindosis die zur Zerstörung von 50 % eines Zellrasens führt) des CPB2h1 mehr als 10fach niedriger als die des CPB2h2 (400 ng/ml respektive 6 µg/ml).

Auch hinsichtlich ihrer Antigenität wurden Unterschiede für die beiden Beta2-Varianten nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe von Songer konnte in Western-Blot-Untersuchungen mit dem monoklonalen, gegen rekombinantes, His-markiertes Konsensus-Beta2-Toxin gerichteten Antikörper sowohl rekombinantes, His-markiertes, atypisches Beta2, als auch natives Konsensus-Beta2 in *C. perfringens*-Kulturüberständen nachweisen (Bueschel, Jost et al. 2003; Jost, Billington et al. 2005). Allerdings gelang bei keinem *C. perfringens*-Isolat mit atypischem *cpb2* (n=33) der Nachweis der Toxinexpression, woraus die Autoren schlussfolgern, dass diese Isolate nicht exprimieren können (2.4). Es ist aber durchaus vorstellbar, dass die untersuchten Stämme atypisches Beta2-Toxin exprimierten, was mit dem monoklonalen Antikörper lediglich nicht detektiert werden konnte, zumal andere Arbeitsgruppen die Expression atypischen Beta2-Toxins darstellen konnten. Lebrun et al. konnten beispielsweise mit gegen Konsensus-Beta2 gerichteten polyklonalen Antikörpern von Kaninchen in Western-Blot-Untersuchungen beide Beta2-Varianten detektieren (Lebrun, Filee et al. 2007). Ein anderes Serum gegen Beta2-Toxin von equinen Isolaten konnte Konsensus-Beta2 deutlich besser detektieren als atypisches (Lebrun, Filee et al. 2007). Es kann somit geschlussfolgert werden, dass die Epitope beider Varianten aufgrund der Sequenzunterschiede und vielleicht auch aufgrund unterschiedlicher Konformationen zum großen Teil nicht identisch sind. Vermutlich können in einem antikörperbasierten Nachweisverfahren, wie es im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, insbesondere bei Verwendung monoklonaler Anti-Beta2-Antikörper nicht alle Beta2-Varianten detektiert werden.

Mit der Varianz des *cpb2* setzten sich Johansson et al. detaillierter auseinander (Johansson, Aspan et al. 2006). Der umfassende Vergleich eines 425 Nukleotide umfassenden Fragments eigener Isolate (n=22) und veröffentlichter Sequenzen (n=66) bestätigte die Existenz von zwei evolutionär getrennten *cpb2*-Populationen, in denen wiederum jeweils drei Cluster (porcine, nonporcine und Lebensmittelvergiftungs-Isolate) unterschieden werden konnten. Interessanterweise gehörten sämtliche europäischen Sequenzen tierischer Isolate ausschließlich Gruppe 1 an, die auch Konsensus-*cpb2* enthielt. Hingegen waren die meisten Isolate aus Gruppe 2 amerikanischen Ursprungs und ähnelten dem atypischen Beta2-Toxin. Die Ergebnisse amerikanischer Arbeitsgruppen (Jost, Billington et al. 2005; Fisher 2006), die

fast ausschließlich atypisches Beta2 in nonporcinen Isolaten nachwiesen, müssen vor diesem Hintergrund kritisch betrachtet werden, da sie vermutlich nicht die europäischen Verhältnisse widerspiegeln. Allerdings ist auch denkbar, dass durch die Verwendung unterschiedlicher Primerkombinationen eventuell in einigen Studien Gruppe 2-Sequenzen gar nicht erst detektiert werden konnten (van Asten, Allaart et al. 2008) (2.7). Die „europäischen“ Primer von Klaasen et al. (Klaasen, Molkenboer et al. 1999) sind beispielsweise zur Detektion des atypischen *cpb2* (Jost, Billington et al. 2005) nicht geeignet.

Neben den beschriebenen Varianten wurden von Chalmers et al. drei weitere Beta2-Sequenzen aus *C. perfringens*-Isolaten von Broilern veröffentlicht, die den Gruppen nicht zugeordnet werden können (Chalmers, Martin et al. 2008).

## **2.4 Die Regulation der Beta2-Toxin-Expression**

Für den Nachweis des Beta2-Toxins in einem ELISA, wie er im Rahmen dieser Dissertation entwickelt wurde, ist natürlich entscheidend, ob bzw. unter welchen Bedingungen ein Beta2-toxinogenes *C. perfringens*-Isolat Toxin exprimiert wird. In Bouillonkulturen konnte ein *cpb2*-mRNA-Peak in der späten Log-Phase beobachtet werden. Beta2 wird also nicht erst bei der Versporung gebildet, wie beispielsweise Enterotoxin (Czeczulin, Collie et al. 1996).

In mehreren Studien konnte allerdings in Kulturüberständen Beta2-toxinogener Clostridienisolate kein Toxin nachgewiesen werden (Herholz, Miserez et al. 1999; Bueschel, Jost et al. 2003; Jost, Billington et al. 2005; Crespo, Fisher et al. 2007; Lebrun, Filee et al. 2007). Es ist bislang ungeklärt, wodurch diese Diskrepanz zwischen Geno- und Phänotyp in den entsprechenden Isolaten bedingt ist. Möglicherweise sind die Kulturbedingungen ausschlaggebend für die Expression (Fisher 2006). Eventuell handelt es sich bei einigen Isolaten aber auch um echte Expressionsmutanten. Diese Hypothese wird durch zwei Untersuchungen (Bueschel, Jost et al. 2003; Jost, Billington et al. 2005) gestützt, in denen gerade die nonporcinen Isolate, für die eine pathogenetische Bedeutung des Beta2-Toxins weniger wahrscheinlich ist (2.5), keine Toxinbildung zeigten. Vorstellbar ist aber auch, dass die für den Expressionsnachweis genutzten, antikörperbasierten Verfahren gar nicht zur Detektion aller Beta2-Varianten geeignet waren (2.3).

Die Expression des Beta2-Toxins wird durch das VirR/VirS-Zweikomponenten-System reguliert (Ohtani, Kawsar et al. 2003). Die Histidin-Kinase VirS wird auf bislang ungeklärte Weise durch Phosphorylierung aktiviert und überträgt ihrerseits eine Phosphatgruppe auf VirR, welches anschließend an die sogenannte VirR-Box binden kann. Hierdurch kommt es

zur Aktivierung eines Promoters, der die Transkription regulatorischer VR-RNA kontrolliert, die zur Beta2-Toxin-Bildung führt (Vidal 2009). Das VirR/VirS-System und somit die Beta2-Toxin-Expression ist interessanterweise *in vitro* durch Kontakt zu Caco-2-Zellen induzierbar (Vidal, Ohtani et al. 2009), wobei der genaue Mechanismus nicht bekannt ist. Der Kontakt zu einer Darmepithel-Zelllinie führt also unmittelbar zur Erhöhung der Transkriptionsrate und gesteigerter Toxinexpression, was eventuell teilweise das für manche Stämme beobachtete Fehlen einer Toxinbildung unter Kulturbedingungen bei Nachweis des Toxins erklärt. Vermutlich existieren auch weitere Regulationsmechanismen, welche die *in vitro*-Expression in einem Teil der *C. perfringens*-Isolate regulieren könnten. Kürzlich konnten Nowell et al. die Beta2-Toxin-Expression von Stämmen mit defektem VirR/VirS-System nachweisen (Nowell, Kropinski et al. 2012).

Eine Herunterregulierung der Beta2-Toxin-Expression konnte von Allaart et al. bei *in vitro*-Co-Kultivierung von *C. perfringens*-Isolaten mit *Lactobacillus fermentum* beobachtet werden. Die Autoren sehen den durch den Milchsäurebildner erzeugten sauren pH-Wert als entscheidend für die reduzierte Toxinbildung der in ihrem Wachstum nicht beeinträchtigten Clostridien (Allaart, van Asten et al. 2011). Allerdings kommt es auch unter den fermentativen Bedingungen einer reinen Clostridien-Bouillonkultur zur Ansäuerung des Mediums (Booth 1985). Trotzdem wird Beta2-Toxin, wie auch beispielsweise Alpha- und Theta-Toxin, erst in der späten Log-Phase der Kultur bzw. danach verstärkt gebildet (Fisher, Fernandez-Miyakawa et al. 2006; Vidal, Ohtani et al. 2009). Hierfür ist vermutlich nicht der pH-Wert verantwortlich, sondern, so lassen aktuelle Untersuchungen vermuten, ein *quorum sensing*-Mechanismus. In Versuchen mit isogenen AgrB Knockout-Mutanten ohne funktionelles *Agr-like quorum sensing*-System wurde die Expression von Beta2-, Alpha-, Theta- und Enterotoxin sowie auch die Fähigkeit zur Sporulation beeinträchtigt (Chen and McClane; Li, Chen et al. 2011). Erhöhte Erregerkonzentrationen, beispielsweise durch massive Vermehrung im unbesiedelten Darm proteinreich gefütterter Jungtiere, könnten somit zu einer erhöhten Toxinproduktion führen.

Vilei et al. beschreiben für einige Isolate von u. a. Pferd, Rind und Schaf einen weiteren Mechanismus zur Regulation der Beta2-Toxin-Expression. Mehrere Beta2-toxinogene Isolate exprimierten im Gegensatz zu Schweineisolaten *in vitro* kein Beta2-Toxin, obwohl es immunhistochemisch in intestinalen Läsionen, aus denen sie isoliert wurden, nachweisbar war (Vilei, Schlatter et al. 2005; Waters, Raju et al. 2005). Durch Sequenzierung wurde die Deletion eines Nukleotids in einem Poly-A-Trakt, einer sogenannten *slippery codon sequence*, nachgewiesen, die zu einem *frame shift* und hierdurch zur Expression eines *nonsense*-

Oligopeptids (9 AS) führt (Vilei, Schlatter et al. 2005). Die Zugabe von Gentamycin oder Streptomycin zum Kulturmedium führte jedoch auch bei diesen Isolaten zur Beta2-Toxin-Bildung. Vermutlich bedingte die Interaktion des Antibiotikums mit dem bakteriellen Ribosom Leserasterverschiebungen im Bereich der *slippery codon sequence* und hierdurch die vollständige Toxinexpression (Vilei, Schlatter et al. 2005). Der beobachtete Mechanismus bietet auch einen Erklärungsansatz, warum Kolik-Pferde, die präoperativ mit Gentamycin behandelt werden, häufiger an Typhlocolitis erkranken als unbehandelte (Vilei, Schlatter et al. 2005).

## **2.5 Zur Frage der pathogenetischen Bedeutung des Beta2-Toxins**

Seit seiner Entdeckung 1997 wurde Beta2-Toxin bzw. sein Gen *cpb2* in Isolaten von zahlreichen Wild- (Aschfalk and Muller 2001; Bacciarini, Pagan et al. 2001; Aschfalk and Muller 2002; Aschfalk, Valentin-Weigand et al. 2002; Boujon, Henzi et al. 2005; Greco, Madio et al. 2005; Crespo, Fisher et al. 2007; Cai, Gao et al. 2008; Jores, Derocher et al. 2008; Shivaprasad, Uzal et al. 2008; Nikolaou, Kik et al. 2009; Sting 2009; Shome, Shome et al. 2010) und Haustierspezies (Hazlett, Kircanski et al.; Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997; Dennison, Van Metre et al. 2005; Johansson, Aspan et al. 2006) nachgewiesen und mit unterschiedlichen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Eine Bedeutung insbesondere für Durchfallerkrankungen ist naheliegend, da das Darmepithel Zielzelle des Toxins zu sein scheint (2.6). Die überwiegend epidemiologischen Studien erlauben bislang allerdings keine eindeutige Bewertung seiner Bedeutung für die Pathogenese *C. perfringens*-bedingter Erkrankungen (van Asten, Nikolaou et al. 2010). Bei vielen Veröffentlichungen handelt es sich um Einzelfallbeschreibungen. Teilweise wurde das Toxin in der Sektion nachgewiesen und eine postmortale Clostridienvermehrung und Toxinbildung kann nicht ausgeschlossen werden (Fisher 2006). Zudem weisen zahlreiche Studien die Anwesenheit des *cpb2*-Gens nach, die nicht zwingend auch zur Expression von Beta2-Toxin führt (2.4). Weiterhin können Beta2-toxinogene *C. perfringens*-Stämme immer wieder bei gesunden Tieren, regelmäßig beispielsweise bei Geflügel (Bueschel, Jost et al. 2003; Chalmers, Martin et al. 2008; Cooper, Theoret et al. 2010; Farzan, Kircanski et al. 2013), nachgewiesen werden. Die starke Korrelation von Erkrankung und Toxin(-gen)-Nachweis lässt zwar bei einigen Tierspezies eine Bedeutung des Toxins für die Pathogenese vermuten, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Beta2-Toxin lediglich ein Marker für die Erkrankung ist und selbst nicht zur Pathogenese beiträgt.

Es gibt unter anderem Hinweise auf eine Bedeutung des Beta2-Toxins für die Typhlocolitis des **Pferdes** (Herholz, Miserez et al. 1999; Bacciarini, Boerlin et al. 2003; Bueschel, Jost et al. 2003; Vilei, Schlatter et al. 2005). Für einige Isolate konnte nachgewiesen werden, dass sie erst in Anwesenheit subinhibitorischer Antibiotika-Konzentrationen Beta2-Toxin exprimieren. Demzufolge könnte das Toxin auch eine Bedeutung im Rahmen Antibiotika-assoziiierter Diarrhoen besitzen (Vilei, Schlatter et al. 2005).

Auch beim **Kalb** wird eine Bedeutung für die Pathogenese von Jungtierdurchfällen diskutiert (van Asten, Nikolaou et al. 2010). In frühen Untersuchungen konnten Gennachweis und Enterotoxämien nicht korreliert werden. Allerdings zeigte ein *cpb2*-positives Isolat deutlichere Läsionen im *ligated intestinal loop*-Modell als 3 negative Stämme (Manteca, Daube et al. 2002). Untersuchungen von Bueschel et al. belegten ein gehäuftes Auftreten (47,3 %) *cpb2*-positiver Isolate bei Kälbern mit Enteritis oder Abomasitis (Bueschel, Jost et al. 2003). Nur 12,8 % aller getesteten Rinderisolate besaßen ein Beta2-Toxigen (Bueschel, Jost et al. 2003). In einer Studie von Lebrun et al. waren von 41 *C. perfringens*-Typ A-Isolaten an Enterotoxämie erkrankter Kälber (n=8) 68 % *cpb2*-positiv. Bei Isolaten (n=87) der Kontrollgruppe gesunder Tiere (n=14) gelang der Nachweis von *cpb2* nur in 46 % der Fälle (Lebrun, Filee et al. 2007). Interessanterweise besaßen 100 % der *cpb2*-positiven Isolate der Enterotoxämiegruppe das Konsensus-Beta2-Toxigen, welches zudem von über 64 % exprimiert wurde. In der Kontrollgruppe besaßen nur 67,5 % der Stämme Konsensus-*cpb2* und von diesen bildeten lediglich 22 % Toxin (Lebrun, Filee et al. 2007). Die Autoren vermuten, dass *C. perfringens*-Subpopulationen mit starker Konsensus-Beta2-Toxinbildung Auslöser von Erkrankungen sein könnten (Lebrun, Filee et al. 2007).

Für **kleine Wiederkäuer** scheint eine Bedeutung des Beta2-Toxins für Jungtierdurchfälle aufgrund der wenigen, bislang verfügbaren Daten eher unwahrscheinlich (Gkiourtzidis, Frey et al. 2001; Dray 2004; Greco, Madio et al. 2005a; Greco, Madio et al. 2005b). Auch für **Nutzgeflügel** mehren sich insbesondere in aktuellen Untersuchungen die Hinweise darauf, dass das Beta2-Toxin, welches gleichermaßen bei gesunden wie kranken Tieren nachgewiesen wird, keinen Virulenzfaktor darstellt (Engstrom, Fermer et al. 2003; Gholamiandekhordi, Ducatelle et al. 2006; Siragusa, Danyluk et al. 2006; Crespo, Fisher et al. 2006; Cooper, Theoret et al. 2010). Untersuchungen von *C. perfringens*-Isolaten durchfallkranker **Hunde** lassen zurzeit noch keine Rückschlüsse auf eine eventuelle Bedeutung des Beta2-Toxins zu (Gobeli, Berset et al.; Thiede, Goethe et al. 2001).

Auch für den **Menschen** wird eine Bedeutung des Beta2-Toxins im Rahmen von Krankheitsbildern wie beispielsweise der AAD diskutiert (Harrison, Raju et al. 2005; Carman,

Sayeed et al. 2008). Fisher stellte fest, dass ~80 % der AAD-Isolate ein *cpb2*-Gen besaßen, wohingegen Isolate aus Lebensmittelvergiftung nur zu 11 % *cpb2*-positiv waren. Allerdings relativiert sich die Bedeutung dieses Fundes durch die Tatsache, dass die bei AAD-Isolaten nachgewiesene Beta2-Variante CPB2h1 regelmäßig auf dem gleichen Plasmid liegt, wie das für die Pathogenese der Erkrankung bedeutende Enterotoxin (Fisher 2006; Miyamoto, Fisher et al. 2006).

Beim **Saugferkeldurchfall** scheint eine Bedeutung in der Pathogenese aufgrund der folgenden Punkte am wahrscheinlichsten (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997; Klaasen, Molkenboer et al. 1999).

- Beim Saugferkel ist der Anteil *cpb2*-positiver *C. perfringens*-Isolate höher als bei jeder anderen untersuchten Tiergruppe (Sting 2009; Heydel 2012).
- Beim Saugferkel wird nahezu ausschließlich die hochkonservierte Konsensus-*cpb2*-Variante nachgewiesen (Jost, Billington et al. 2005; Heydel 2012)
- Isolate ausgewachsener Schweine und anderer Tierspezies (Ausnahme Kalb (Lebrun, Filee et al. 2007)) besitzen seltener *cpb2* und oft die atypische Variante (Jost, Billington et al. 2005; Heydel 2012).
- Beta2-toxinogene Ferkelisolat exprimieren das Toxin auch *in vitro* regelmäßig; im Gegensatz zu Isolat von adulten Schweinen und anderen Tierspezies (Bueschel, Jost et al. 2003; Fisher 2006).
- Der Gen-Nachweis ist beim Ferkel mit Durchfallerkrankungen korreliert (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997; Klaasen, Molkenboer et al. 1999; Garmory, Chanter et al. 2000; Bueschel, Jost et al. 2003; Waters, Savoie et al. 2003).
- Mutterschutzimpfstoffe ohne Beta2-Komponente können im Gegensatz zu bestandsspezifischen Vakzinen (Heydel 2012) bzw. einem neuen Handelsimpfstoff mit Beta2-Toxoid (Springer 2012) die Erkrankung der Saugferkel nicht verhindern.

Aufgrund der unklaren Bedeutung Beta2-Toxigen-positiver Isolate in den unterschiedlichsten Krankheitsbildern scheint eine Untersuchungsmethode notwendig, die den Nachweis der Toxinbildung erbringt. Insbesondere beim Ferkel würde eine solche Methode (eventuell sogar direkt auf Kotproben angewendet) die Aussagekraft einer Routinediagnostik deutlich verbessern.



## 2.6 Die toxische Wirkung des Beta2-Toxins

*In vitro* weist das Beta2-Toxin gegenüber **CHO-Zellen** (Chinese Hamster Ovary Cells) und der intestinalen **Epithelzelllinie I407** eine zytotoxische Aktivität auf (Jolivet-Reynaud, Popoff et al. 1986; Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997). Bei Konzentrationen von 20 µg/ml zeigten sich eine Hemmung der Thymidin-Aufnahme und Zellabrundungen (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997). Effekte auf das Zytoskelett, wie Desorganisation der Aktinfilamente oder eine Hemmung der Aktinpolymerisation, konnten nicht beobachtet werden (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997). Beta2-Toxin besitzt zudem weder eine UDP-Glucosylierungs-, noch eine ADP61-Ribosylierungs-Aktivität (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997). Der Wirkmechanismus des Beta2-Toxins ist bislang nicht vollständig geklärt, allerdings wurde schon frühzeitig vermutet, dass es, wie viele andere clostridiale Toxine, ein Porenbildner oder zumindest ein membranaktives Toxin sein könnte (Petit, Gibert et al. 1999). Untersuchungen von Fisher et al. unterstützen diese Annahme. **Caco-2-Zellen**, eine humane Darmepithelzelllinie, zeigte in Anwesenheit des Toxins zytotoxische Veränderungen wie Zellablösungen, Nukleusverdichtungen und Membranauftreibungen (Fisher, Miyamoto et al. 2005). Zudem konnte nach Inkubation mit rekombinantem Beta2-Toxin eine erhöhte Durchlässigkeit der Caco-2-Zellen gegenüber <sup>86</sup>Rubidium dargestellt werden. Geschützt wurden die Zellen durch die Zugabe von Dextran (~1500 Da), nicht aber Saccharose (~342 Da), wodurch sich der Durchmesser der vermeintlich gebildeten Poren auf 342–1500 Da eingrenzen ließ. Auch Gurjar untersuchte den Effekt von Beta2-Toxin auf Caco-2-Zellen (Gurjar 2008). Neben Membranauftreibungen beschreibt er das Anschwellen der Zellen bis zur Ruptur der Zellwand und dem Austritt von Zytoplasma. Gurjar bewertet die hohen Beta2-Konzentrationen (> 10 µg/ml), die notwendig waren um diese Effekte hervorzurufen, als Hinweis darauf, dass es sich um ein „akzessorisches Toxin“ handelt, welches ähnlich beispielsweise dem Theta-Toxin einen synergistischen Effekt mit anderen *C. perfringens*-Toxinen, insbesondere dem Alpha- und dem Beta-Toxin, entfaltet (Gurjar 2008). Allerdings nutzte er ein rekombinant in *E. coli* exprimiertes Toxin. Die erfolglosen Versuche zahlreicher Arbeitsgruppen biologisch aktives Beta2 in heterologen Expressionssystemen wie *E. coli* oder *Bacillus subtilis* zu gewinnen (Heydel 2010) lassen vermuten, dass Gurjars Toxin zum Großteil inaktiviert vorlag. Zudem verliert aufgereinigtes Beta2-Toxin rasch an Aktivität, was eine Quantifizierung toxischer Eigenschaften erschwert. Außer Gurjar gelang es lediglich Roskens Dalzell, in einem *E. coli*-Wirt toxisches Beta2 zu induzieren (Roskens Dalzell 2008). Dieses war in seiner Wirkung auf Caco-2-Zellen aber

nochmals deutlich abgeschwächt und zeigte deutliche Effekte erst in Konzentrationen von 100 µg/ml. Neben CHO-, I407- und Caco-2-Zellen wurden bislang keine empfindlichen Zelllinien beschrieben. Die Eignung von I407-Zellen zur Darstellung der Toxizität von Beta2-Toxin ist zudem umstritten. Für ein analog in der gleichen Studie gewonnenes Beta-Toxin wurde die I407-Toxizität durch spätere Studien widerlegt (Shatursky, Bayles et al. 2000; Nagahama, Hayashi et al. 2003). Keinen Effekt hatte das Toxin auf Vero-Zellen, humane und murine Fibroblasten, Hep-Zellen und transformierte Intestinalzellen (Jolivet-Reynaud, Popoff et al. 1986). An der porcinen Zelllinie IPI-21 und Caco-2-Zellen ließ sich mittels porcinen und humanen Beta2-Toxinpositiven Typ A *C. perfringens*-Kulturüberständen *in vitro* keine toxischen Wirkung des Beta2-Toxins nachweisen (Allaart, van Asten et al. 2014).

Bei **Mäusen** ruft die Applikation von Beta2-Toxin Paralysesymptome hervor (Jolivet-Reynaud, Popoff et al. 1986). Die minimale letale Dosis (LD<sub>min</sub>) des aus Kulturüberständen eines *C. perfringens* Typ-C-Ferkelisolates (CWC245) aufgereinigten Beta2-Toxins lag nach intravenöser Applikation bei 4 µg Toxin/Tier (Jolivet-Reynaud, Popoff et al. 1986). Für ein rekombinant in *C. perfringens* exprimiertes Beta2-Toxin ermittelte die gleiche Arbeitsgruppe mit 3 µg/Tier eine geringfügig niedrigere LD<sub>min</sub> (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997). Rekombinantes, ebenfalls aus *C. perfringens*-Kulturüberständen gewonnenes Beta2-Toxin von Vilei et al. war nach intraperitonealer Injektion deutlich weniger toxisch. Die LD<sub>50</sub> lag hier bei 200 µg/Maus (Vilei, Schlatter et al. 2005).

An der Haut von **Meerschweinchen** konnten nach intradermaler Applikation von 2 µg Toxin nekrotische Veränderungen beobachtet werden (Jolivet-Reynaud, Popoff et al. 1986). Auch der Meerschweinchendarm reagierte auf die Anwesenheit von Beta2-Toxin im Lumen. Im „ileal-loop-test“ riefen 100 µg Beta2-Toxin innerhalb von 2 Stunden Blutungen hervor. Mikroskopisch waren Zerstörungen von Villi und Mukosa sichtbar und die Submukosa stellte sich ödematisiert dar (Jolivet-Reynaud, Popoff et al. 1986).

Fisher belastete **Kaninchen** zur Darstellung der Toxizität eines rekombinanten Beta2-Toxins. CPB2h1 bewirkte nach intradermaler Injektion nur geringe Veränderungen. Lediglich leichte Nekrosen und Ödeme sowie die Immigration von Leukozyten konnten beobachtet werden (Fisher 2006). Im „ileal-loop-test“ konnte an Dünndarmschlingen eine Schädigung der Zotten dargestellt werden. Das Colon reagierte mit verstärkter Schleimbildung (Fisher 2006).

Manteca et al. untersuchten die enterotoxische Wirkung des Beta2-Toxins auf die Darmschleimhaut 14 Tage alter **Kälber** (Manteca, Daube et al. 2002). Nach Inokulation eines Beta2-Gen-positiven *C. perfringens* Typ A-Stammes in Darmschlingen wurden makroskopisch hämorrhagisch-nekrotisierende Veränderungen beobachtet, die durch Beta2-

Gen negative Isolate nicht hervorgerufen wurden. Histologisch waren Infiltrationen mit polymorphkernigen und mononukleären Zellen und Nekrosen der Intestinalvilli erkennbar (Manteca, Daube et al. 2002). Da keine isogenen Mutanten verwendet wurden, können diese Veränderungen auch durch andere Virulenzfaktoren bedingt sein.

## **2.7 Der Nachweis von Beta2-Toxin bzw. seines Gens *cpb2***

Zahlreiche Verfahren wurden beschrieben, die den direkten Nachweis des Beta2-Toxins bzw. seines Gens *cpb2* ermöglichen. Am häufigsten wurden PCR-Untersuchungen zur genotypischen Charakterisierung der Toxovare genutzt. Zunächst wurden vor allem *cpb2*-Monoplex-PCRs entwickelt und angewendet (Herholz, Miserez et al. 1999; Garmory, Chanter et al. 2000; Aschfalk and Muller 2001; Thiede, Goethe et al. 2001; Kießling 2004). Konservative Multiplex-PCRs (Meer and Songer 1997; Bueschel, Jost et al. 2003; Dennison, Van Metre et al. 2005; Ferrarezi, Cardoso et al. 2008; Badagliacca, Di Provvido et al. 2010) sowie auch zwei Real-Time-Verfahren (Albini, Brodard et al. 2008; Gurjar 2008) erlaubten neben dem Nachweis des Beta2-Toxingens die Zuordnung zu einem der Toxovare A-E und/oder zusätzliche Aussagen zum Vorkommen einzelner Minortoxingene. Einige Arbeitsgruppen nutzten auch Southern Blot- (Waters, Raju et al. 2005; Thompson, Parreira et al. 2006), Manteca et al. ein Kolonie-Hybridisierungs-Verfahren (Manteca, Daube et al. 2002), um *cpb2* nachzuweisen. Ein Microarray-System zur Detektion von unter anderem Beta2-DNA wurde von Al-Khaldi et al. entwickelt (Al-Khaldi, Myers et al. 2004; Al-Khaldi, Villanueva et al. 2004). Auch zur Differenzierung von atypischem und Konsensus-Beta2 wurden Verfahren entwickelt. So können beide Varianten in einer Triplex-PCR (Jost, Billington et al. 2005) oder durch Restriktion gewonnener PCR-Produkte (van Asten, Allaart et al. 2008) unterschieden werden.

Für alle *cpb2*-Nachweisverfahren ist die Varianz des Gens problematisch. Die Nukleotidsequenzen von atypischem und Konsensus-Beta2-Toxin sind nur zu ca. 70 % identisch (Jost, Billington et al. 2005). Nicht alle Arbeitsgruppen verwendeten Primer- bzw. Sondensequenzen, die zur Detektion beider Varianten geeignet sind (2.3). So lässt sich beispielsweise mit den für zahlreiche epidemiologische Studien genutzten Primern von Klaasen et al. (Klaasen, Molkenboer et al. 1999) und Gurjar et al. (Gurjar, Hegde et al. 2008), sowie mit der von Albini et al. entwickelten Sonde (Albini, Brodard et al. 2008) die von Jost et al. veröffentlichte atypische *cpb2*-Sequenz (GenBank AY609161) (Jost, Billington et al.

2005) nicht nachweisen. Da dieses atypische Toxin nur bei Isolaten von Ferkeln selten ist und bei Isolaten von adulten Schweinen und anderen Tierarten dominiert, wurden vermutlich bei vielen Spezies die *cpb2*-Prävalenzen in epidemiologischen Untersuchungen falsch eingeschätzt.

Die PCR ist bei einer Primerauswahl unter Berücksichtigung der Heterogenität des *cpb2* für Prävalenzuntersuchungen zur Verbreitung des Gens gut geeignet. Allerdings ist nicht jedes *cpb2*-positive Isolat auch zur Toxinbildung befähigt (2.4). Durch die Detektion von *cpb2*-mRNA kann die erfolgreiche Transkription des Gens nachgewiesen werden. Neben einer qualitativen Reverse Transkriptase-(RT-)PCR (Waters, Raju et al. 2005) wurden quantitative RT-PCRs entwickelt, um die Transkriptionsrate von *C. perfringens*-Isolaten gezielt untersuchen zu können (Vidal, McClane et al. 2008; Allaart, van Asten et al. 2011). Des Weiteren wurden einige Northern Blot-Verfahren (Ohtani, Kawsar et al. 2003; Harrison, Raju et al. 2005; Waters, Raju et al. 2005) zum Nachweis von *cpb2*-mRNA eingesetzt.

Um die Fähigkeit eines Isolates, Beta2-Toxin zu bilden, sicher beurteilen zu können muss der direkte Toxinnachweis mit spezifischen Antikörpern erfolgen. Viele Arbeitsgruppen haben erfolgreich Western Blot-Verfahren auf Basis spezifischer polyklonaler Antikörper entwickelt (Bueschel, Jost et al. 2003; Fisher, Miyamoto et al. 2005; Vilei, Schlatter et al. 2005; Waters, Raju et al. 2005; Lebrun, Filee et al. 2007; Gurjar 2008; Heydel 2010; Allaart, van Asten et al. 2011; Zeng, Deng et al. 2011). Meist wurden Antiseren von mit rekombinant in *E. coli* exprimierten Beta2-Toxinen geimpften Mäusen oder Kaninchen verwendet. Neben dem Nachweis der Toxinbildung können Western Blot-Verfahren auch zur Beurteilung der vom Isolat gebildeten Toxinmenge genutzt werden (Fisher, Fernandez-Miyakawa et al. 2006) wodurch eine eingehendere Charakterisierung der Virulenz möglich wird. Nachteil des Western Blots ist, dass er nur die *in vitro*-Toxinbildung isolierter Stämme darstellen kann, von der, wie bereits zuvor beschrieben (2.4), nicht zwangsläufig auf die *in vivo*-Expression geschlossen werden darf.

Um sicher die Fähigkeit eines Isolates, Beta2-Toxin *in vivo* zu bilden und die Bedeutung des Toxins für die Pathogenese einer Erkrankung beurteilen zu können, muss der direkte Toxin-Nachweis im geschädigten Gewebe oder in Kotproben erfolgen. Mehrfach gelang die immunhistochemische Darstellung des Beta2-Toxins in Darmläsionen (Bacciarini, Pagan et al. 2001; Vilei, Schlatter et al. 2005; Uzal, Fisher et al. 2008; Nikolaou, Kik et al. 2009). Allerdings eignet sich die aufwendige Methode sicherlich nicht für routinediagnostische Zwecke, zumal für diese nicht immer auf entsprechendes Sektionsmaterial zurückgegriffen werden kann. Die direkte Detektion des Toxins im Kot beispielsweise mit einem ELISA wäre

gemäß Fisher wohl die ideale Methode (Fisher 2006). Für andere *C. perfringens*-Toxine (Alpha-, Beta- und Epsilon-Toxin) sind bereits kommerzielle ELISA-Systeme erhältlich (Firma BioX-Diagnostics, Jemelle, Belgien), die nicht nur die Detektion in Kulturüberständen, sondern auch direkt im Kot erlauben. Beta2-Toxin ist jedoch hochempfindlich gegenüber intestinalen Proteasen wie Trypsin (Gibert, Jolivet-Reynaud et al. 1997; Fisher 2006) und daher vermutlich in Kotproben degradiert und nicht mehr nachweisbar (Dennison, Van Metre et al. 2005; Fisher 2006). Allerdings konnten Dennison et al. Beta2-Toxin im oberen Verdauungstrakt (Rumen, Duodenum, Jejunum) von Rindern in einem ELISA mit Mäuseseren detektieren (Dennison, Van Metre et al. 2005).

Für alle antikörperbasierten Beta2-Toxin-Nachweise gilt, wie auch für den Nachweis des *cpb2*-Gens, dass die Varianz der Beta2-Sequenz die Sensitivität beeinträchtigen kann. Atypisches und Konsensus-Beta2 sind auf Aminosäureebene lediglich zu 62,3 % identisch und zu 80,4 % ähnlich (Jost, Billington et al. 2005). In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Antikörper beide Toxinvarianten, wenn auch teilweise unterschiedlich effektiv, detektieren konnten (2.3). Zudem scheint auch für natives, für denaturiertes und eingeschränkt für degradiertes Toxin der Nachweis mit den gleichen Antiseren möglich (2.2).

Der indirekte Beta2-Toxin-Nachweis durch serologische Untersuchungen scheint aufgrund des ubiquitären Vorkommens des Sporenbildners *C. perfringens* und des häufigen Nachweises des Beta2-Toxingens, selbst in Isolaten aus Boden- und Wasserproben (Mueller-Spitz, Stewart et al.; Sengupta, Alam et al.; Johansson, Aspan et al. 2006), für diagnostische Zwecke ungeeignet, da ein Kontakt mit dem Antigen generell wahrscheinlich ist. Timoney et al. etablierten einen ELISA zur Serumkontrolle im Rahmen eines rBeta2-Impfversuchs mit Pferden (Timoney, Hartmann et al. 2005). Andere Arbeitsgruppen nutzten Western Blot-Verfahren zur Detektion Beta2-spezifischer Antikörper im Blut (Zeng, Deng et al. 2011), allerdings vorwiegend zur Kontrolle der Antikörperbildung im Rahmen der Herstellung spezifischer Antiseren für den direkten Toxinnachweis.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Verwendete Bakterienstämme

Alle verwendeten Beta2-toxinogenen *C. perfringens*-Feldisolate stammten aus Kotproben von Ferkeln; die Herkunft und Bezeichnung der Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme**

Spezies	Stammbezeichnung	Isolierungsort	Herkunft
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 17/00	Kot, Ferkel	IDT <sup>1)</sup>
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 18/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 19/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 28/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 38/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 39/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 40/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 75-3/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 83/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 99/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 129/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 142/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 143/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 144/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 145/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT 146/00	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1409	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1431	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1447	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1454	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1455	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1464	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1466	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1492	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1493	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1499	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1506	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	IDT/MB 1508	“-	IDT
<i>C. perfringens</i> Typ A	P 950/00	“-	IHIT <sup>2)</sup>

**Tab. 1**      **Fortsetzung 1:**

Spezies		Stammbezeichnung	Isolierungsort	Herkunft
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 5042/99	Kot, Ferkel	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 5655/99	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 9109/99	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 9112/99	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 734/00	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 2045/1/00	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 2045/2/00	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 2046/00	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 8141/00	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 8142/00	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 8169/00	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 8861/00	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 8862/00	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6586/2/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6616/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P6726/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6727/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6810/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6848/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6852/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6896/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6901/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6902/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P6974/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6976/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 6980/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 7077/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 7964/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 8044/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 8375/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 8379/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	P 8380/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	3866/04	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ A	3878/04	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	IDT 16-99	-"	IDT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	IDT 17-99	-"	IDT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	IDT 20/00	-"	IDT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	IDT 30/00	-"	IDT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	IDT 76-4/00	-"	IDT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	IDT 148	-"	IDT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	P 7498/00	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	P 744/2/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	P 776/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	P 1465/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i>	Typ C	P 6737/2/00	-"	IHIT

**Fortsetzung Tab. 1:**

<u>Spezies</u>	<u>Stammbezeichnung</u>	<u>Isolierungsort</u>	<u>Herkunft</u>
<i>C. perfringens</i> Typ C	P 7465/01	-"	IHIT
<i>C. perfringens</i> Typ C	P 7462/01	-"	IHIT
<i>Staph. aureus</i>	P 4936/02a	Haut, Hund	IHIT
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC	-	ATCC <sup>3)</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	928/02	Augentupfer, Rind	IHIT
<i>Proteus vulgaris</i>	x-300/99	-	PHLS <sup>4)</sup>
<i>E. coli</i> (O147:K89)	P 7270/01-2	Schwein	IHIT
<i>E. coli</i> (O149:K91)	P 7848/01-3	Schwein	IHIT
<i>Sc. equisimilis</i>	K 6344/01	Schwein, Haut	IHIT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P 8410/01	Ohr, Hund	IHIT
<i>C. bifermentans</i>	1189/89	-	IHIT
<i>C. perfringens</i> (Beta2-)	IDT 131/00	Kot, Ferkel	IDT
<i>C. septicum</i>	6812	-	IHIT

- 1) Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, Dessau, Deutschland
- 2) Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus Liebig-Universität, Gießen, Deutschland
- 3) American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, U.S.A.
- 4) Public Health Laboratory Service (PHLS), London, GB

**3.2 Anzucht der Bakterienstämme**

Die Anzucht der verwendeten Bakterienstämme fand auf Zeissler-Nährböden (siehe Anhang) statt. Nach Ausstreichen einer Einzelkolonie bzw. Bakteriensuspension wurden die Platten in Anaerobiertöpfen (Fa. Oxoid, Hampshire, GB) unter Verwendung von AnaeroGen<sup>TM</sup> Beuteln (An 25, Fa. Oxoid, Hampshire, GB) 18 Stunden bei 37°C anaerob bebrütet (Brutschrank Thermicon T, Heraeus, Hanau). Parallel wurden alle Stämme zur Kontrolle auf Blut-Agar-Platten (siehe Anhang) ausgestrichen und für 18 Stunden aerob bei 37°C bebrütet.

Einzelkolonien der gewonnenen Reinkulturen wurden in Leberbouillon nach Tarozzi (siehe Anhang) überimpft (18 bis 48 h; 37°C). Vor Gebrauch wurden die Leberbouillons für 10 min bei ca. 90°C (Wasserbad GFL, Medizin und Labortechnik Kretschmer, Gießen) erhitzt und anschließend mit flüssigem Paraffin überschichtet (Fa. Merck, Darmstadt). Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte in Leberbouillon bei Raumtemperatur.



### **3.3 Ammoniumsulfatfällung**

Aus einer Leberbouillon wurden ca. 8 ml des jeweiligen Kulturüberstandes entnommen, in 50 ml *C. perfringens*-Medium I (CPMI, siehe Anhang) überführt und für 18 Stunden bei 37°C anaerob bebrütet. Der Überstand wurde steril abpipettiert, in COREX-Glas Röhrchen (neoLab®, Fa. neoLab, Heidelberg) überführt und zentrifugiert (7 Minuten, 3500 x g, 4°C, SORVALL RC-5B Kühlzentrifuge, U.S.A.). Anschließend wurde der hierdurch erhaltene Überstand mit gesättigter Ammoniumsulfat  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ -Lösung im Verhältnis 1 : 1 eiskalt versetzt und bei 4°C unter leichtem Rühren eine Stunde inkubiert. Der Ansatz wurde in COREX-Glas Röhrchen überführt und für 1 Stunde zentrifugiert (10.000 x g). Der Überstand wurde dekantiert und das gewonnene Pellet in 1 ml Proteasehemmer (100 ml 1 x PBS pH 7,4; 2 ml Trasylol® [Fa. Bayer, Leverkusen]; 500 µl PMSF  $[\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}]$ , Fa. Sigma, Taufkirchen) aufgenommen und resuspendiert. Die nun vorliegenden Suspensionen wurden sofort verwendet.

### **3.4 Dialyse**

Vor ihrer Verwendung in der SDS-PAGE wurden die aus den Kulturüberständen durch die Ammoniumsulfatfällung gewonnen Produkte unter leichtem Rühren gegen 1 x PBS (pH 7,4) bei 4°C für 18 Stunden dialysiert. Zuvor wurde der Dialyseschlauch (Fa. Serva, Heidelberg, 6 mm) zunächst für mindestens 15 min in Aqua bidest gewässert.

### **3.5 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Protein Assay Reagent der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, (München; Best.-Nr. 500-0006) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### **3.6 Herstellung des rekombinanten Beta-2-Toxins in E.coli**

#### **3.6.1 Anzucht des TOP10 F<sup>'</sup>/pHIT-VIc-40**

Der Expressionsklon TOP10F<sup>'</sup>/pHIT-VIc-40 wurde auf einer LB-Platte/Ampicillin (100 µg/ml; siehe Anhang) ausgestrichen und bei 37°C für 24 Stunden inkubiert.

#### **3.6.2 Expression und Induktion**

Zur Herstellung einer Vorkultur wurde eine Einzelkolonie des Expressionsklons TOP10F<sup>'</sup>/pHIT-VIc-40 vom Vortag in 10 ml LB-Medium/Ampicillin (100 µg/ml; siehe Anhang) angeimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 U/Minute in einem Schüttelinkubator (GFL 3033, Burgwedel) inkubiert. Anschließend wurden die 10 ml Vorkultur in 500 ml Expressionskultur (LB-Medium/Ampicillin [100 µg/ml]) überführt und bei 32°C in einem Schüttelinkubator bei 180 U/Minuten inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>550 nm</sub> von 0,5 (Beckmann DU-600 Photometer, U.S.A.) erfolgte die Induktion der Expressionslösung durch Zugabe von 12,5 µl Anhydrotetracyclin-Lösung (2 mg/ml Anhydrotetracyclin/Dimethylformamid) und die Expressionskultur wurde für weitere 4 Stunden inkubiert.

Nach anschließender Zentrifugation (5000 x g, 25 min, 10°C, SORVALL RC-5B Kühlzentrifuge, U.S.A) und Verwerfen des Kulturüberstandes wurden die gewonnenen *E. coli*-Zellen in Periplasmapuffer P (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM Saccharose; 1 mM EDTA, 1 ml je 100 ml Kultur) resuspendiert. Es folgte eine dreißigminütige Inkubation auf Eis und eine erneute Zentrifugation (14.000 x g, 10 min, Tischzentrifuge 5145 C, Fa. Eppendorf, Hamburg). Nach Abnahme des periplasmatischen Extraktes (Überstand), wurde dieser zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.6.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung des rekombinanten Beta2-Toxins**

Die affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des am COOH-Terminus fusionierten Affinitätsanhängsels (Strep-TagII) der exprimierten Proteine, unter Verwendung einer speziellen StrepTactin-Sepharose-Matrix (Institut für Bioanalytik, Göttingen).

Hierfür wurden die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Extrakte 15 min bei  $14.000 \times g$  (Tischzentrifuge 5145 C, Fa. Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und bis zum Auftrag auf Eis gestellt. Zuvor erfolgte das Äquilibrieren der Säulenmatrix mit  $2 \times 5$  ml Waschpuffer (Puffer W, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0). Dann wurden 5 bis  $10 \times 1,5$  ml Periplasmaextrakt aufgetragen. Die Säule wurde nach vollständigem Durchfluss der Proteinlösung mit 6 ml Waschpuffer gespült, der Durchlauf (Periplasmaextrakt) aufgefangen, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die spezifischen Proteine wurden mit  $8 \times 1$  ml Elutionspuffer (Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin) fraktioniert eluiert. Zur Regeneration der StrepTactin-Matrix wurden  $4 \times 5$  ml Puffer R (Puffer W mit 1 mM HABA [4-Hydroxybenzen-2-carboxylsäure]) auf die Säule aufgegeben. Danach erfolgte eine Waschprozedur mit  $3 \times 5$  ml Puffer W. Nach der Aufreinigung wurde die Matrix mit 3 ml Puffer W beschichtet und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Lagerung der aufgereinigten Proteine erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **3.7 Herstellung von polyklonalem Anti- Beta2-Serum in der Maus und im Kaninchen**

### **3.7.1 Tierversuche**

Die in Gießen durchgeführten Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen unter den Aktenzeichen II 25.3 – 19 c 20 – 15 (1) GI 18/6 – Nr. 05/2000 (Schreiben vom 8. März 2000), VI 63 – 19 c 20 – 15 (1) GI 18/6 – Nr. 05/2000 (Schreiben vom 4. Dezember 2003) genehmigt.

### **3.7.2 Versuchstiere**

Zur Herstellung des polyklonalen anti-Beta2-Serums wurden sechs 6 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse sowie zwei 5 Monate alte weibliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer (Fa. Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln) verwendet. Die Mäuse wurden auf Sägespäne-Einstreu in Typ III Standardkäfigen aus Makrolon untergebracht. Die Kaninchen wurden in Einzelboxen (60 cm breit, 63 cm hoch und 85 cm tief) gehalten. Alle Tiere wurden mit pelletierten Alleinfutter und über Flaschentränken mit Wasser ad libitum versorgt.

### **3.7.3 Impfantigen**

Das Adjuvans MF59 (Fa. Chiron, Marburg) wurde 1 : 1 mit rekombinantem Beta2-Toxin (50 µg) gemischt und den Mäusen intraperitoneal verabreicht. Die Kaninchen erhielten subcutan 50 µg (in 250 µl Elutionspuffer und 250 µl Alu-Gel) des rekombinanten Beta2-Toxins 1 : 1 versetzt mit Alu-Gel [Al(OH)<sub>3</sub>] (Fa. Serva, Heidelberg).

### **3.7.4 Impfschemata**

Mäuse wurden am Tag 1 und 21, Kaninchen am Tag 1, 21 und 36 immunisiert.

### **3.7.5 Serumgewinnung**

Durch i.p. Applikation des Injektionsanästhetikums Avertin (300 µl/Tier, siehe Anhang) wurden die Mäuse am 24. Tag narkotisiert. Mittels Lidreflex wurde die Betäubungstiefe kontrolliert. Als nächstes erfolgte die cervikale Dislokation mit anschließender Dekapitation. Das Blut wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf, Hamburg) aufgefangen, für eine Stunde bei 37°C unter Bewegung inkubiert (Bellco-Roller-Drum, Fa. Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald-Steinbach) und über Nacht bei 4°C stehengelassen. Am nächsten Tag wurde das Blut 10 min bei 10.000 x g (Tischzentrifuge 5145 C, Fa. Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert, Serum abgenommen und erneut für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Am 59. Versuchstag wurden die Kaninchen, nach Prämedikation mit Atropin (0,5 mg/kg s.c.), zur terminalen Blutentnahme in Narkose gelegt (25 mg/kg Ketamin; 5 mg/kg Rompun i.m.). Nach Feststellung eines hyporeflektorischen Lidreflexes bei normoreflektorischem Cornealreflex wurden die Tiere, mittels Eröffnen von Arteria carotis und Vena jugularis, durch Blutentzug getötet.

Das Blut wurde in sterilen 100 ml Zentrifugenbechern aufgefangen, für eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen und für 10 min bei 1300 x g abzentrifugiert (SORVALL RC-5B Kühlzentrifuge, U.S.A). Anschließend wurde das Serum in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt und bei -20°C gelagert.

### 3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden, im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer nach Laemmli (1970) versetzt, 5 min bei 100°C erhitzt. Ein Molekulargewichtsstandard (SeeBlue™ Pre-Stained, Fa. Novex, San Diego, U.S.A.) wurde mitgeführt und ebenfalls bei 100°C für 5 min gekocht. Nach vollständiger Polymerisation der Gele erfolgte der Auftrag der Proben. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tab. 2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE**

<u>Stammlösung</u>	<u>Trenngel 12,5%ig</u>	<u>Sammelgel</u>
Tris-HCl Puffer (2 M pH 8,6)	2,5 ml	-
Tris-Phosphat Puffer (0,6 mM pH 6,8)	-	250 µl
Acrylamid: N,N'-Methylen-bis-acrylamid 30:0,8	5 ml	-
Acrylamid: N,N'-Methylen-bis-acrylamid 50:1,5	-	250 µl
Harnstoff (8 M)	3,75 ml	1,5 ml
SDS (20%ig)	62,5 µl	12,5 µl
Aqua bidest	890 µl	450 µl
Ammoniumpersulfat (10%ig)	60 µl	75 µl
TEMED	10 µl	2,5 µl

Die Elektrophorese erfolgte in Minigel-Twin-Kammern (Fa. Biometra, Göttingen) bei einer konstanten Stromstärke von 120 V mit einer Laufzeit von ca. 2 h. Zur Gelfärbung wurde die **Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung** (siehe Anhang) verwendet, in der die Gele für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend erfolgte für mehrere Stunden die Entfärbung mittels Methanollösung (Coomassie-Entfärber) (siehe Anhang), bis der Hintergrund der Gele wieder farblos war. Die **Silberfärbung** der Polyacrylamidgele wurde mit dem Silver-Stain-Kit der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München; Best.-Nr. 161-0444, 161-0445, 161-0450) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### 3.9 Immunoblotverfahren

Die mittels der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde unter Verwendung des Semi-Dry-Verfahrens (Kyhse-Anderson, 1984) auf eine Nitrocellulose-Membran (NC) transferiert (Protan, Fa. Schleicher und Schüll). Die hierfür verwendeten 18 Elektrodenpapiere und die NC wurden auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten. Auf die untere Graphitanode der Elektroblokkammer (Fa. Keutz, Reiskirchen) wurden 6 in Anodenpuffer I (siehe Anhang) und 3 in Anodenpuffer II (siehe Anhang) getränkte Elektrodenpapiere gelegt. Auf diese Elektrodenpapiere wurden die vorher für 30 min in 1 x PBS (pH 7,4) vorinkubierte NC sowie nachfolgend, das in Anodenpuffer II äquilibrierte SDS-Polyacrylamidgel und 9 in Kathodenpuffer getränkte Elektrodenpapiere, gelegt. Nach Aufsetzen der Graphitkathode erfolgte der Proteintransfer bei einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 2 h. Der Erfolg des Transfers wurde durch Färben des Gels mit Coomassie-Brilliantblau überprüft. Zur Renaturierung wurde die NC über Nacht bei 4°C in 1 x PBS (pH 7,4) aufbewahrt.

Zum Absättigen freier Bindungsstellen wurde die NC für eine Stunde bei 37°C in 1 : 10 mit Aqua bidest verdünnten Pepton-Blockpuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) inkubiert. Nach dem Blocken wurde die NC dreimal für 5 min in 1 x PBS + 0,05% Tween 20 (siehe Anhang) gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit dem polyklonalen anti-Beta2-Mausserum (1 : 1000; 20 µl Serum/20 ml 1 x PBS, pH 7,4). Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation der Membran mit 1 : 1000 in 1 x PBS (pH 7,4) verdünntem Anti-Mouse-IgG-Peroxidase-Konjugat (Fa. Amersham, Freiburg) für 1 h bei 37°C. Die NC wurde dreimal mit 1 x PBS (pH 7,4) für je 5 min gewaschen und anschließend die Substratlösung (2 ml Chloronaphthol [3 mg 4-Chlor-1-Naphthol/ml Methanol] mit 8 ml

1 x PBS [pH7,4] und 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) versetzt und hinzugefügt. Nach deutlichem Sichtbarwerden der Enzymreaktion wurde die Reaktion mit Aqua bidest gestoppt. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schwenken in Kunststoffschalen.

### **3.10 Herstellung monoklonaler Antikörper**

#### **3.10.1 Versuchstiere**

Zur Herstellung von Hybridomazelllinien und zur Gewinnung von Peritonealmakrophagen wurden insgesamt sechs 8 bis 12 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse (Fa. Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln) verwendet.

#### **3.10.2 Impfschema**

Für die Grundimmunisierung sowie zur Boosterung wurde das Adjuvans MF59 (Fa. Chiron, Marburg) verwendet. Das Impfvolumen für die i.p. Applikation betrug je nach Beta2-Toxin-Konzentration 100-300  $\mu$ l. Die intravenöse Applikation erfolgte mit einem Volumen von maximal 100  $\mu$ l. In Tabelle 3 ist das Impfschema dargestellt.

**Tab. 3: Impfschema zur Gewinnung monoklonaler Antikörper**

Tag	Rekombinantes Beta2-Toxin (µg/Maus)	MF 59 (µl)	Applikation
1	50	166	i.p. <sup>1)</sup>
28	50	300	i.p.
56	50	100	i.p.
84	50	166	i.p.
96	50	166	i.p.
109	50	166	i.p.
115	50	166	i.p.
154	50	166	i.p.
174	50	-	i.v. <sup>2)</sup>

1) i.p. = intraperitoneal

2) i.v. = intravenös

### 3.10.3 Präparation muriner Peritonealmakrophagen

Weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen wurden durch cervikale Dislokation getötet. Die Gewinnung der Peritonealmakrophagen ( $M_0$ ) erfolgte durch mehrmalige Lavage der Peritonealhöhle mit eiskalter PBS-EDTA-Lösung (5 ml/Spülvorgang mit ca. 0,5 ml Luft). Nach zweimaligem Waschen in PBS-EDTA (202 x g, 7 Minuten, 4°C) wurden die Zellen unter Trypanblau-Ausschluß ausgezählt und auf 96-Lochplatten (F-Form, Fa. Nunc, Wiesbaden) ( $1 \times 10^6$   $M_0$ /Platte) ausplattiert. Feederzellen für Klonierungen wurden in RPMI 1640-Medium ausplattiert (100 µl/well). Zur Fusion wurden die Feederzellen in RPMI 1640 Medium mit AH-Medium (Azaserin [1 µg/ml], Hypoxanthin [13,6 µg/ml]) supplementiert und ausplattiert (100 µl/well). Die Feederzellen wurden erst 2 bis 5 Tage vor der Fusion oder Klonierung ausgesät. Die Lochplatten wurden bei 37°C unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Spannung und Wasserdampfsättigung inkubiert.



### 3.10.4 Myelomzelllinie und Fusionstechnik

Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 (Kearny et al., 1979) wurden mit den gewonnenen Milzzellen (s. Tabelle 4) fusioniert. Die Myelomzellen wurden 2 Wochen vor der Fusion in Petrischalen (Fa. Greiner) mit RPMI 1640-Medium mit 10% FCS und 2 mM Glutamin sowie Standardantibiotika (Penicillin 100 U/ml / Streptomycin 100 µg/ml) vermehrt. Die Myelomzellen befanden sich zum Zeitpunkt der Fusion in der logarithmischen Wachstumsphase. Zur Fusion wurden Milz- und Myelomzellen im Verhältnis 2 : 1 eingesetzt. In der Tabelle 4 ist der Ablauf der Fusion schematisch dargestellt.

**Tab. 4: Herstellung von Hybridomen zur Produktion monoklonaler Antikörper**

<u>Milzzellen</u>	<u>Myelomzellen (X63-Ag8.653)</u>
Töten der Maus durch cervikale Dislokation	
Entnahme der Milz	
↓	
Entfernen der Kapsel	
Zerkleinern der Milz in RPMI 1640-Grundmedium, 4°C	
↓	
Zweimalige Spontansedimentation für jeweils 3 Minuten	
in RPMI Grundmedium bei 4°C	
↓	
Poolen der Überstände	
↓	
Waschen in D'PBS, 4°C,	Waschen in D'PBS, 4°C,
zweimalige Zentrifugation	zweimalige Zentrifugation
(242 x g, 7 Minuten, 4°C)	(242 x g, 7 Minuten, 4°C)
↓	↓
Filtration über feuchte Baumwolle	
↓	↓

**Fortsetzung Tab. 4:**

Bestimmung der Gesamtzellzahl



Bestimmung der Gesamtzellzahl



Mischen im Verhältnis 2 : 1  
(Milzzellen : Myelomzellen)



Zentrifugation (170 x g, 10 Minuten, 4°C)



Vollständige Abnahme des Überstandes,  
Lösen des Pellets



Zugabe von 1 ml Polyethylenglycol 1500 (50%, Roche),  
(37°C) unter leichter Bewegung des Behältnisses



Einminütige Inkubation bei 37°C



Zweimalige Zugabe von je 10 ml RPMI Grundmedium  
innerhalb von 7 Minuten bzw. 3 Minuten unter  
vorsichtigem Bewegen



Zentrifugation (170 x g, 10 Minuten, RT)



Resuspension des Pellets in RPMI-Medium  
supplemetiert mit AH-Medium; Einstellen der Zellzahl



Ausplattieren auf 96F-Platte (Fa. Nunc, Wiesbaden) mit  
100 µl/well  $M_0$  in AH-Medium + 100 µl/well  
Fusionszellen in AH-Medium ( $2 \times 10^7$  reine  
Milzzellen/Platte)

### **3.10.5 ELISA zum Nachweis Beta2-Toxin-Antikörper-produzierender Hybridomazellen**

Der Nachweis Beta2-Toxin-Antikörper-produzierender Hybridomazellen erfolgte 14 Tage nach der Fusion mittels eines direkten Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Hierfür wurden die „wells“ von 96-Loch-Mikrotiterplatten (NUNC-Maxisorb, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit 0,5 µg rBeta2-Toxin, vorgelegt in 100 µl Waschpuffer, beschichtet. Nach einstündiger Inkubation der Platten bei 37°C auf einer Wippe wurden die Titerplatten dreimal bei 5 min mit 200 µl Waschpuffer (1 x PBS mit 0,05% Tween 20, pH 7,2) bei Raumtemperatur gewaschen. Zum Blocken freier Bindungsstellen wurden 200 µl eines 1 : 10 mit Aqua bidest verdünnten Pepton-Blockpuffers (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf einer Wippe und anschließend erneut eine dreimalige Waschprozedur. Als nächstes erfolgte die Zugabe von 50 µl Hybridomaüberstand pro Plattenvertiefung. Es schlossen sich eine einstündige Inkubation bei 37°C und dreimaliges Waschen an. Zum Nachweis gebundener Hybridomazellen wurde ein 1 : 2000 in 1 x PBS (pH 7,4) verdünntes Anti-Maus-Peroxidase-Konjugat (Fa. Amersham, Freiburg) verwendet. Pro Plattenvertiefung wurden 100 µl der Konjugatgebrauchslösung pipettiert. Nach der Inkubation für 1 h bei 37°C und einem letzten dreifachen Waschschrift wurden abschließend 100 µl einer 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfinic Acid) (ABTS)-Substratlösung (5 mg ABTS [Fa. Serva, Heidelberg] in 10 ml Substratpuffer [20 mM Na-Citrat/PBS pH 4,2] + 5 µl 30%ige Wasserstoffperoxid-Lösung [Fa. Merck, Darmstadt] pro „well“ pipettiert. Es folgte eine 15 minütige Inkubation bei 37°C. Die Messung der Extinktion erfolgte in einem Titertek-Multiscan Photometer (Fa. Flow Laboratories, Meckheim) bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Wiederholt negative getestete Fusionsprodukte wurden verworfen. Beta2-Toxin spezifische Antikörper produzierende Hybridomazellen wurden weiter kultiviert, auf 24-Lochplatten (F-Form, Fa. Nunc, Wiesbaden) umgesetzt und bei genügend hoher Zellzahl kloniert.

### **3.10.6 Klonierung**

Aus je einer Vertiefung einer 96- bzw. 24-Lochplatte (F-Form, Fa. Nunc, Wiesbaden) wurden die Hybridomazellen gezählt und auf eine Verdünnung von 10 Zellen/ml eingestellt und anschließend auf eine 96F-Platte (Fa. Nunc, Wiesbaden) mit  $1 \times 10^6$  M<sub>0</sub>/Platte ausplattiert

(100 µl/Vertiefung). Nach 14 Tagen erfolgte eine Überprüfung der Überstände auf Beta2-spezifische Antikörper (siehe 3.10.5). Hybridomazellen, die Beta2-spezifische Antikörper produzierten, wurden mehrmals subkloniert.

Nach Abschluß der Klonierung wurden Kryokonserven der etablierten Zellklone angelegt. Hierfür wurden die Zellen in DMSO (Dimethylsulfoxid, Fa. Sigma, Taufkirchen) zu FCS 1 : 5 aliquotiert ( $2 \times 10^6$ /Aliquot) und in Kryovials (Fa. Nunc) bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **3.10.7 Massenproduktion der monoklonalen Antikörper**

Nach dem Klonieren wurden die Zellklone in Petrischalen (Fa. Greiner) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung im Brutschrank kultiviert. Als Nährmedium diente Zellkulturmedium 1 (siehe Anhang). Die Hybridomazellen wurden zur Massenproduktion von mAk in einer Dichte von  $10^5$  Zellen/ml in ROUX-Flaschen verbracht und bis zum Absterben der Zellen kultiviert. Die gewonnenen Überstände (Zentrifugation bei 3291 x g, 10 min, 20°C) wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Zur anschließenden chromatographischen Aufreinigung wurden die Antikörper in 2% Ultrosor<sup>®</sup> HY-Medium (UHY, Fa. Biosepra, Frankreich) kultiviert.

### **3.10.8 Subklassenbestimmung**

Die IgG-Subklassenbestimmung der gewonnenen mAk erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Mouse-Monoclonal-Antibody-Isotyping-Kit (Best.-Nr.1493027, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

### **3.10.9 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper mittels Protein G-Sepharose-Säule**

Die Aufreinigung von mAk der Hybridomazelllinien 2-4A5-D8-F7 und 2-4C11-F3-B3-A2 erfolgte mit einer Protein G-Sepharose 4 Fast Flow Säule (Fa. Pharmacia, Freiburg). Die Säule wurde unter Verwendung einer FPLC<sup>®</sup>-Anlage (Fa. Pharmacia, Freiburg) mit

Laufpuffer (1 x PBS, pH 7,0) äquilibriert, der Schreiber (Fa. Pharmacia, Freiburg) auf die Basislinie eingestellt und mit 250 ml filtrierten und entgasten Kulturüberstandes der Zelllinien 2-4A5 und 2-4C11 mit 0,8 ml/min beladen. Bei der Aufreinigung wurde die optische Dichte des Durchflusses kontinuierlich photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt und von dem Schreiber protokolliert. Die Säule mit der eingegangenen Proteinlösung wurde nach dem Auftrag mit Laufpuffer (1 x PBS; pH 7,0) gewaschen, bis erneut eine stabile Basislinie erreicht war. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mit 0,1 M Glycin/HCl (pH 2,7). Der Elutionspeak wurde aufgefangen und mit 60 µl 1M Tris/HCl (pH 9,0) je ml Eluat neutralisiert. Anschließend erfolgte die Neutralisation der Säule mit 1 x PBS (pH 7,0). Nach der Sterilfiltration (DynaGard Kurzfilter, Wiesbaden) wurden die Antikörper in 1.000 µl Aliquots portioniert und bei 4°C gelagert.

### **3.10.10 ELISA zum Nachweis von Maus-Immunglobulinen der Klasse IgG**

Die Proben aus der Säulenchromatographie wurden zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Maus-Immunglobulinen der Klasse IgG in einem indirekten „Capture-Enzym-Linked Immunosorbent Assay“ (Capture-ELISA) untersucht.

Eine Mikrotiterplatte (NUNC-Maxisorp, Fa. Nunc, Wiesbaden) wurde mit jeweils 1 µg Anti-Maus IgG (sheep anti-mouse IgG [H + L]) pro Vertiefung in 100 µl Coatingpuffer (siehe Anhang) beschichtet und bei 4°C für 12 h inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit 200 µl Waschpuffer pro „well“ (1 x PBS, 0,05% Tween 20, pH 7,2) dreimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurde mit 200 µl Blockpuffer pro Vertiefung (1% bovines Serumalbumin in Coatingpuffer) geblockt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Anschließend wurde die Platte wie oben beschrieben dreimal gewaschen. Es folgte die Zugabe der Chromatographie-Proben jeweils in mehreren Verdünnungsstufen (100 µl/Napf). Nach anschließender einstündiger Inkubation bei 37°C und dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe von biotinylierten Schaf-Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörpern in der Konzentration 1 : 10.000 (100 µl/Plattenvertiefung). Es folgte die erneute Inkubation der Mikrotiterplatte für 1 h bei 37°C. Danach wurde die Platte dreimal für 5 Minuten gewaschen und mit Streptavidin/biotinylierten Meerrettichperoxidase-Komplexen in der Konzentration 1 : 10.000 bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Vertiefungen der Titerplatte ein letztes Mal in der beschriebenen Weise gewaschen. Anschließend wurden 100 µl pro „well“ mit der Substratlösung [5 mg ortho-Phenylendiamin

und 3  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) in 10 ml Substratpuffer (siehe Anhang)] für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Abschluß erfolgte das Abstoppen der Enzymreaktion mit 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50  $\mu\text{l}$ /Napf) und die Messung der Extinktion im Titertek-Multiscan Photometer (Fa. Flow Laboratories, Meckenheim) bei einer Wellenlänge von 492 nm. In jeder Mikrotiterplatte wurde als Standard eine Verdünnungsreihe von Maus-IgG mitgeführt. Die Nachweisgrenze des Testsystems betrug ca. 0,1 ng/ml.

### **3.11 Titration der Antikörper und des Antigens**

#### **3.11.1 Fangantikörper (Beta2-spezifische mAk 2-4A5 und 2-4C11)**

Die mAk 2-4A5 und 2-4C11 wurden jeweils im Doppelansatz in  $\log_2$ -Stufen auf die Mikrotiterplatte austitriert. Anschließend wurde die Platte für 1 Stunde bei 37°C auf einer Wippe inkubiert und mit 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer (1 x PBS, 0,05% Tween, pH 7,2) dreimal 5 min gewaschen. Das Blocken erfolgte mit Pepton-Blockpuffer (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), der 1 : 10 mit Aqua bidest verdünnt wurde. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei 37°C mit anschließendem Waschen, wie oben beschrieben. Die Titerplatte wurde mit 100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung Anti-Maus-Peroxidase-Konjugat (1 : 2.000) für eine Stunde bei 37°C inkubiert und ein letztes Mal in der beschriebenen Weise gewaschen. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$ /Napf 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzthiazolinesulfinic Acid) (ABTS)-Substratlösung (5 mg ABTS [Fa. Serva, Heidelberg] in 10 ml Substratpuffer [20 mM Na-Citrat/PBS pH 4,2] + 5  $\mu\text{l}$  30%ige  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung. Bei einer Wellenlänge von 405 nm wurde die optische Dichte in einem Titertek-Multiscan Photometer gemessen.

#### **3.11.2 Nachweisantikörper (Beta2-spezifisches polyklonales Serum vom Kaninchen)**

Das Serum wurde ab einer Verdünnung von 1 : 100 in  $\log_2$ -Stufen auf eine mit 0,3  $\mu\text{g}$ /100  $\mu\text{l}$  mAk 2-4A5, 0,4  $\mu\text{g}$ /100  $\mu\text{l}$  2-4C11 beschichtete und anschließend mit 0,5  $\mu\text{g}$ /100  $\mu\text{l}$  rBeta2-Toxin inkubierte Mikrotiterplatte titriert.

### **3.11.3 Rekombinantes Beta2-Toxin**

Das rBeta2-Toxin wurde im Doppelansatz in log<sub>2</sub>-Stufen auf eine mit 0,3 µg/100 µl mAk 2-4A5 und 0,4 µg/100 µl 2-4C11 beschichtete Mikrotiterplatte austitriert

### **3.12 Kompetitiver Epitop-ELISA**

Zum Epitopnachweis der monoklonalen Antikörper 2-4A5 und 2-4C11 wurde der mAk 2-4C11 biotinyliert.

Es wurden 1,5 ml des mAk 2-4C11 zu 6 ml Aceton (Fa. Merck, Darmstadt) gegeben und für 1 Stunde bei –20°C kühlgestellt. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 4°C mit 10.000 x g (SORVALL RC-5B, Kühlzentrifuge, U.S.A.) zentrifugiert und das Pellet in 200 µl 50 mM NaHCO<sub>3</sub>-Puffer aufgenommen. Es wurden 50 µl Biotin-Stammlösung (1 mg Biotin/1 ml DMF) (EZ-Link<sup>TM</sup>NHS-LC-Biotin; Fa. Pierce, U.S.A) (N,N-Dimethylformamide; Fa. Acros Organics,U.S.A.) hinzugegeben und für 2 Stunden auf Eis gestellt. Um das ungebundene Biotin zu entfernen wurde eine NAP-5-Säule (Fa. Pharmacia, Freiburg) mit 15 ml NaHCO<sub>3</sub> gewaschen, 210 µl der biotinylierten mAk-Lösung auf die Säule gegeben und aufgefangen. Die Säule wurde mit 15 ml 1 x PBS (pH 7,4) gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurde der biotinylierte mAk 2-4C11 bei 4°C gelagert.

Die Proteinbestimmung des mAk 2-4C11 erfolgte nach der Methode von Bradford (3.5). Im ersten Ansatz wurden auf eine mit 0,5 µg rBeta2 pro „well“ beschichtete, mit Pepton-Blockpuffer (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) geblockte und zweimal gewaschene (siehe 3.10.5) Mikrotiterplatte der nicht-biotinylierte mAk 2-4A5 in log<sub>2</sub>-Stufen aufgetragen und für 1 Stunde bei 37°C auf einer Wippe inkubiert. Der biotinylierte mAk 2-4C11 wurde mit 1,3 µg/100 µl 1 x PBS (pH 7,4) hinzugegeben, für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und nach beschriebener Methode (siehe 3.10.5) gewaschen. Anschließend wurde ein 1 : 2.500 in Waschpuffer verdünntes Streptavidin-biotinylatec-Peroxidase-Konjugat (Fa. Amersham, Freiburg) verwendet. 100 µl der Konjugatgebrauchslösung wurden in jede Vertiefung der Titerplatte pipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit nachfolgender Waschprozedur. Nach Zugabe der Substratlösung (5 mg ortho-Phenylendiamin und 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [30%] in 10 ml Substratpuffer [20 mM Na-Citrat/PBS, pH 4,2] 100 µl/Vertiefung) wurde die

Titerplatte 20 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend in einem Titertek-Multiscan Photometer (Fa. Flow Laboratories) die Extinktion bei 492 nm gemessen.

Im zweiten Ansatz wurde eine Mikrotiterplatte mit 0,5 µg rekombinanten Beta2-Toxin beschichtet und der mAk 2-4A5 in log<sub>2</sub>-Stufen auf diese Platte austitriert. Der weitere Verlauf des ELISA erfolgte wie unter 3.10.5 beschrieben.

Im dritten Ansatz wurden 1,3 µg des biotinylierten mAk 2-4C11 auf eine mit 0,5 µg rBeta2 beschichtete Titerplatte pipettiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie unter dem ersten Epitop-ELISA beschrieben.

Die Auswertung erfolgte anhand des Vergleichs der Extinktion bei:

- a) Inkubation mit dem homologen mAk (= maximale Hemmung).
- b) Inkubation des biotinylierten mAk ohne weiteren mAk (= maximale Bindung).

Es wurden beide mAk als kompetitiv bezeichnet, wenn die Extinktion der maximalen Bindung gegenüber der Extinktion bei der Inkubation mit einem zweiten mAk (siehe 1. Epitop-ELISA) um mehr als 50% reduziert war. War die Extinktion nicht bzw. nur geringfügig reduziert, so folgte daraus, dass

- 1. beide mAk unterschiedliche Epitope erkennen oder
- 2. der biotinylierte mAk eine wesentlich höhere Affinität zum gleichen Epitop hat und demzufolge den gleichzeitig vorhandenen zweiten mAk verdrängt.

### **3.13 Anionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung des Beta2-Toxins**

Zur Gewinnung von nativem Beta2-Toxin wurden 12 x 10 ml Kulturüberstand des geno (PCR)- und phänotypisch (Capture-ELISA) Beta2-positiven Stammes (IDT 18/00) ammoniumsulfatgefällt und die so gewonnenen Pellets bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert.

Nach dem Auftauen wurde jedes Pellet mit 1 ml des Loading-Puffers A-Q (250 mM Tris-HCl, 4 mM Natriumazid, pH 8,0; 1 : 10) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 3645 x g (Zentrifuge 5804R Eppendorf, Fa. Eppendorf, Hamburg) für 10 min.



Die weiteren Schritte wurden mit dem Vivapure Q Maxi H-Kit (Göttingen, Best.-Nr.: VSIX20QHGP) der Firma Vivascience AG nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die so gewonnenen Proben wurden auf das Vorhandensein des Beta2-Toxins in der SDS-PAGE-Gelelektrophorese (3.1.4) geprüft.

### **3.14 Immunomagnetische Protein-Isolation**

Zur Aufreinigung des nativen Beta2-Toxins aus *C. perfringens*-Kulturüberständen wurden jeweils 250 µg der mAk 2-4A5 und 2-4C11 zu 1 ml Triethanolamin (0,2 M, pH 8,2) gegeben. Die Dynabeads (Best.-Nr.:100.01, 100.02, Fa. Dynal, Hamburg) wurden in 1 ml DMP (Dimethyl Pimelimidat Dihydrochlorid, 20 mM) in Triethanolamin (0,2 M; pH 8,2) (5,4 mg DMP/ml Puffer) suspendiert und mit den mAk 2-4A5 und 2-4C11 zusammen für 30 min im Rotator (Bellco-Roller-Drum, Fa. Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald-Steinbach) inkubiert. Die in Eppendorf-Caps enthaltenen Proben wurden in den Magnet-Partikel-Konzentrator (enthalten in Dynabeads-Testkit: Best.-Nr.:100.01, 100.02, Fa. Dynal, Hamburg) gesetzt, der Überstand abgenommen, mit 1 ml Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) der Dynabeads resuspendiert und 15 min bei 37°C im Rotator inkubiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Dynabeads wurden dreimal mit je 1 ml PBS (pH 8,1) gewaschen. Die Dynabeads wurden in 100 µl PBS (pH 8,1) aufgenommen und mit 1 ml Kulturüberstand IDT 18/00 (in PBS, pH 8,1) versetzt. Es folgte die Inkubation bei 37°C für eine Stunde im Rotator. Die Probe wurde im Magnet konzentriert, der Überstand verworfen und mit 1 ml 0,1 M Glycin/HCl (pH 2,7) zur Elution des gebundenen Beta2-Toxins für 3 min inkubiert. Zur Neutralisation des pH-Wertes wurden 60 µl 1 M Tris/HCl (pH 9,0) hinzupipettiert. Die Dynabeads wurden zur weiteren Verwendung dreimal mit je 1 ml PBS (pH 8,1) gewaschen und bei 4°C aufbewahrt. Die Überprüfung der Aufreinigung des pH-Wert-neutralen-Beta2-Toxins erfolgte mittels der SDS-PAGE.

### **3.15 Methoden zur Untersuchung der biologischen Aktivität des Beta2-Toxins von *C. perfringens***

#### **3.15.1 *In-vitro*-Testverfahren**

##### **3.15.1.1 Eigelbagar-Diffusions-Trübungstest**

Der Lezithinasenachweis erfolgte mittels Eigelbagar-Platte, in die 4 Vertiefungen gestanzt wurden. Diese wurden mit 10 µl IWP/25 mM CaCl<sub>2</sub> (s. Anhang), 2,5 µg rBeta2-Toxin, 2,5 µg rBeta2-Toxin + 2,5 µg PLC (Phospholipase C) und 2,5 µg PLC beschichtet. Die Platten wurden zwei Stunden bei 37°C und anschließend 10 min bei 4°C inkubiert.

##### **3.15.1.2 Zellkulturtest**

Für den Nachweis der zytotoxischen Wirkung von rekombinantem und nativem Beta2-Toxin auf Zellen wurde die von Gentry und Dalrymple (1980) beschriebene Methode modifiziert.

Im Suspensionsversuch wurde auf eine Mikrotiterplatte (F-Form, Fa. Nunc, Wiesbaden) jeweils das rekombinante (10 µg/ml) und das native (12 µg/ml) Beta2-Toxin, in NaCl-Lösung (0,89%) verdünnt, in Mengen zu 50 µl pro Vertiefung pipettiert und in log<sub>3</sub>-Stufen austitriert. Es wurden 50 µl des entsprechenden Mediums (siehe Tabelle 5) dazu pipettiert und anschließend erfolgte die direkte Zellaussaat ( $4 \times 10^4$ /Vertiefung) (Zellen siehe Tabelle 6) auf die mediumhaltigen Vertiefungen. Es folgte eine Inkubation für 48 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung.

Für die Positivkontrolle wurde SDS (1% in NaCl-Lösung) verwendet, für die Negativkontrolle NaCl-Lösung.

Im Adhäsionsversuch fand auf einer mit dem entsprechenden Medium beschichteten Mikrotiterplatte (F-Form, Fa. Nunc, Wiesbaden) die Zellaussaat ( $4 \times 10^4$ /Vertiefung) statt. Die Platte wurde für 24 Stunden (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, Wasserdampfsättigung) inkubiert. Anschließend wurde das rekombinante Beta2-Toxin (10 µg/ml) in log<sub>3</sub>-Stufen austitriert und die Platte weitere 24 Stunden (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, Wasserdampfsättigung) inkubiert.

Für die Positivkontrolle wurde wiederum SDS (1% in NaCl-Lösung) verwendet, für die Negativkontrolle NaCl-Lösung.

Als Verdunstungsschutz wurden jeweils 100 µl Medium in die äußeren Vertiefungen der Platten pipettiert. Die Proben und Kontrollen wurden im Doppel-oder Dreifachansatz getestet. Die Auswertung zytostatischer und zytotoxischer Effekte wurde durch einen kolorimetrischen Test (modifiziert nach Tada et al. [1986]) unter Verwendung eines Farbstoffes quantifiziert, der nur von lebenden Zellen reduziert wird. Dieser Farbstoff, ein Tetrazoliumsalz, 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird von Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien zu einem lilafarbenen Formazin umgesetzt.

In die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden, am Ende der Inkubationszeit des Zellkulturtests, 25 µl je Ansatz der MTT-Stammlösung (5 mg/ml in 1 x PBS) pipettiert und die Platte unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert (4h, 37°C). Zum Abstoppen der Reaktion erhielt jede Vertiefung 100 µl SDS-Lösung (10% in 0,01 N HCl) mit anschließender Inkubation über Nacht. Mittels eines Titertek-Multiscan Photometer (Fa. Flow Laboratories, Meckenheim) wurden die Extinktionsdifferenzen  $OD_{abs}$  (540 nm als Testwellenlänge, 690 nm als Referenzwellenlänge) gemessen. In der jeweiligen Mikrotiterplatte wurde die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen in Bezug zur Positiv- ( $OD_{pos}$ ) und Negativkontrolle ( $OD_{neg}$ ) angegeben. Zur Ermittlung der relativen optischen Dichte  $OD_{rel}$  wurde folgende Formel verwendet:

$$OD_{rel} = (OD_{abs} - OD_{pos}) / (OD_{neg} - OD_{pos}) \times 100$$

**Tab. 5:        Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Bezug	Herkunft	Medium
Vero	ATCC <sup>1)</sup> CRL 1587	Nierenkarzinom-Zellen der grünen Meerkatze	RPMI 1640
CHO-K1	ECACC <sup>2)</sup> 85051005	epitheliale Ovariumzellen vom Hamster	Ham's F12
3T3n	NHI <sup>2)</sup> Subklon	Mausfibroblasten	RPMI 1640
IEC18	ECACC 88011801	epitheliale Ileumzellen von der Ratte	RPMI 1640
CaCo-2-Zellen	DSMZ <sup>4)</sup>	epitheliale Colonzellen vom Menschen	RPMI 1640

- 1) American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, U.S.A.
- 2) National Institute for Health (NHI), U.S.A
- 3) European Collection of Cell Cultures (ECACC), Weybridge, GB
- 4) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ), Braunschweig

### 3.15.2 *In-vivo*-Testverfahren

#### 3.15.2.1 Tierversuche

Für die Untersuchung der toxischen Wirkung des rBeta2-Toxins in der Maus wurden 11 Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse durch die i.p.-Verabreichung von 0,1 ml/10 g Körpergewicht einer Anästhetikakombination (1 ml Xylazin<sup>®</sup>, 0,75 ml Ketavet<sup>®</sup>, NaCl *ad* 10 ml) narkotisiert und anschließend fixiert. Die verimpften Substanzen sowie die Gruppeneinteilung und die Applikationsroute sind in Tabelle 6 dargestellt.

Zur Überprüfung der toxischen Wirkung von nativem Beta2-Toxin (mittels Anionenaustauschchromatographie aus dem Kulturfiltrat IDT 18/00 extrahiert) in der Maus wurden 7 Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse mit jeweils 300 µl Avertin<sup>®</sup> intraperitoneal narkotisiert und anschließend fixiert. Die Gruppeneinteilung sowie die verimpften Substanzen und die Applikationsroute sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

**Tab. 6: Toxizitätsversuch mit rekombinanten und nativen Beta2-Toxin an BALB/c Mäusen**

Tiergruppen	Anzahl je Toxin(n)	Toxin (µg/100µl) <sup>1)</sup>		Placebo <sup>1)</sup>
		rBeta2	natives Beta2	
Belastungstiere	6	31,37	15,19	-
Kontrolltiere	6	-		PBS (8,1)

1) intravenöse Applikation

### 3.16 Hämolyserversuche

#### 3.16.1 Gewinnung von Kaninchenerythrozyten

Kaninchenblut wurde aus der Vena auricularis lateralis von Kaninchen (aus eigener Zucht) gewonnen und mit einer 3,8 %igen Natrium-Citrat-Lösung im Verhältnis 1 : 3

(Blut : Natrium-Citrat-Lösung) versetzt. Bis zur Verwendung wurde das Blut bei 4°C kühl gestellt.

### **3.16.2 Präparation von Erythrozytenmembranfragmenten mittels fraktionierter Zentrifugation**

Die Präparation von Erythrozytenmembranfragmenten (EMF) wurde nach der Methode von Sakurai et al. (1993) durchgeführt. In IWP (siehe Anhang) gewaschene Kaninchenerythrozyten wurden durch Aufnahme in HWP (siehe Anhang, v/v 1 : 10) lysiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 2.500 x g (Sorvall RC5B, Fa. Beckmann, U.S.A). Die durch Zentrifugation des Überstandes (10 min, 12.000 x g) gewonnenen EMF wurden mehrmals in HWP bis zur Klärung des Überstandes gewaschen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die EMF bei -20°C in HWP unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (0,5 mM PMSF und 10 µl/ml Trasylol®) gelagert.

### **3.16.3 Untersuchung zur hämolytischen Wirkung eines Alphatoxin-Beta2-Toxin Gemisches an Kaninchen – und Ferkelerythrozyten**

Kaninchen- und Ferkelerythrozyten wurden (100 µl Na-Citrat-Blut von Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld) jeweils im Doppelansatz einzeln mit 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 und 0,10 µg Alphatoxin (Fa. Sigma, Deisenhofen, Best.-Nr.: P4039) und rBeta2-Toxin (pHIT-VI-40) sowie gemeinsam (Alphatoxin und rBeta2-Toxin) 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Ansätze bei 80 x g für 15 min wurden 150 µl in eine Mikrotiterplatte (NUNC-Maxisorp, Fa. NUNC, Wiesbaden) pipettiert. Das freigesetzte Hämoglobin wurde bei 540 nm im Titertek-Multiscan Photometer gemessen.

### **3.16.4 Untersuchung zur hämolytischen Wirkung des Alphatoxin-Beta2-Toxin-Gemisches nach Präinkubation mit dem mAk 2-4C11**

Das Alphatoxin, rBeta2-Toxin und der mAk 2-4C11 wurden entsprechend dem in Tabelle 7 dargestellten Schema pipettiert. Nach Inkubation wurden die Versuchsansätze bei 80 x g für 15 min zentrifugiert (Eppendorf, Tischzentrifuge) und 150 µl Überstand in eine Mikrotiterplatte (NUNC-Maxisorp, Fa. NUNC, Wiesbaden) pipettiert. Die Messung des

freigesetzten Hämoglobins erfolgte bei 540 nm im Titertek-Multiscan Photometer. Als Systemkontrollen dienten Erythrozyten mit A. bidest und in IWP mit 0,0025 mM CaCl<sub>2</sub>

**Tab. 7: Versuchsanleitung zur hämolytischen Wirkung des Alphatoxin-Beta2-Toxin-Gemisches nach Präinkubation mit den mAk 2-4C11**

Substanz	Konzentration	Präinkubation mit (30 min, 37°C)		Inkubation nach Zugabe von (30 min, 37°C) Kaninchen- erythrozyten in IWP (100 µl)
		IWP (100 µl)	mAk 2-4C11 (5 µg/100µl)	
Alpha-Toxin	1 µg	+		+
-"	0,5µg	+		+
-"	0,25µg	+		+
-"	0,12µg	+		+
-"	0,06µg	+		+
-"	0,03µg	+		+
Alpha-Toxin & rBeta2-Toxin	1µg	+		+
-"	0,5µg	+		+
-"	0,25µg	+		+
-"	0,12µg	+		+
-"	0,06µg	+		+
-"	0,03µg	+		+
Alpha-Toxin & rBeta2-Toxin	1µg		+	+
-"	0,5µg		+	+
-"	0,25µg		+	+
-"	0,12µg		+	+
-"	0,06µg		+	+
-"	0,03µg		+	+
Alpha-Toxin	1µg		+	+

### 3.16.5 Untersuchung zur hämolytischen Wirkung eines Beta2-positiven *C. perfringens* Typ A-Feldisolates nach Präinkubation mit dem mAk 2-4C11

Der Kulturüberstand des *C. perfringens* Stammes IDT 18/00 wurde über Nacht in CPMI bei 37°C angezüchtet und nachfolgend 7 min bei 2205 x g (Centrifuge 5804R Eppendorf, Rotor A-4-44, Fa. Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Anschließend wurden rBeta2-Toxin, Kulturüberstand und der mAk 2-4C11 entsprechend dem in Tabelle 8 dargestellten Schema pipettiert.

**Tab. 8: Pipettierschema des Hämolysetests nach Präinkubation mit dem mAk 2-4C11**

Substanz / Menge	Präinkubation (30 min, 37°C)		Inkubation nach Zugabe von (30 min, 37°C)
	mAk 4C11	IWP	KE <sup>1)</sup> in IWP
	(5 µg/100 µl)		
rBeta2-Toxin 1 µg	+		+
IWP 100 µl	+		+
IDT 18/00 100 µl		+	+
IDT 18/00 100 µl	+		+

1) KE = Kaninchenerythrozyten

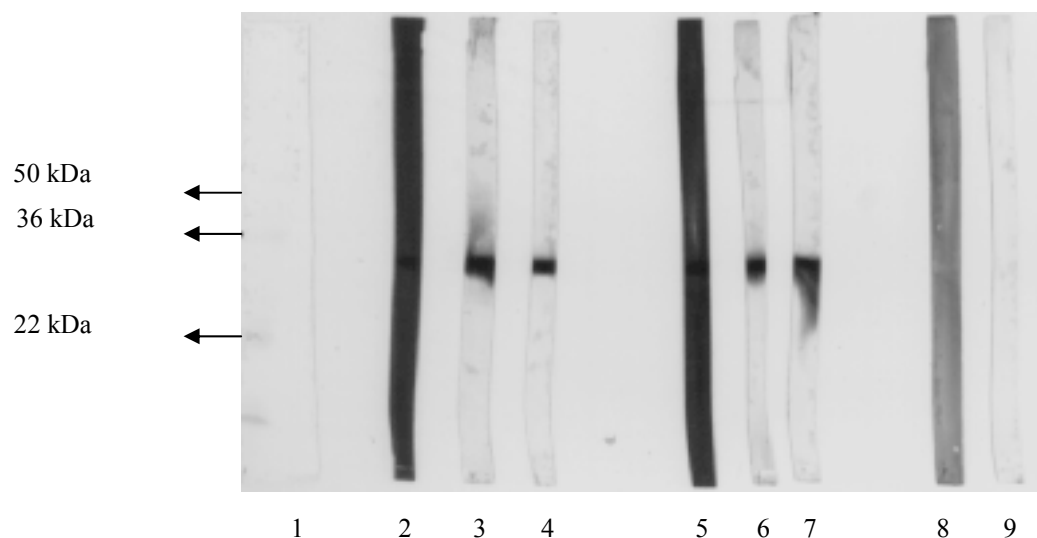
Nach Inkubation wurden die Versuchsansätze bei 80 x g für 15 min zentrifugiert (Eppendorf, Tischzentrifuge) und 150 µl Überstand in eine Mikrotiterplatte (NUNC-Maxisorp, Fa. NUNC, Wiesbaden) pipettiert. Die Messung des freigesetzten Hämoglobins erfolgte bei 540 nm im Titertek-Multiscan Photometer. Als Systemkontrollen dienten Erythrozyten in IWP mit 0,0025 mM CaCl<sub>2</sub>.



## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Nachweis der Bindungsreaktion des Beta2-Hyperimmunserums gegenüber dem rBeta2-Toxin im Immunoblot

Das nach Immunisierung mit dem rekombinanten Beta2-Toxin gewonnene Beta2-spezifische polyklonale Serum von Mäusen wurde im Immunoblot auf seine Reaktivität gegenüber dem rBeta2-Toxin geprüft. Abbildung 1, Spur 2 – 7, zeigt den Nachweis der Beta2-spezifischen Antikörper im Mäuseserum.

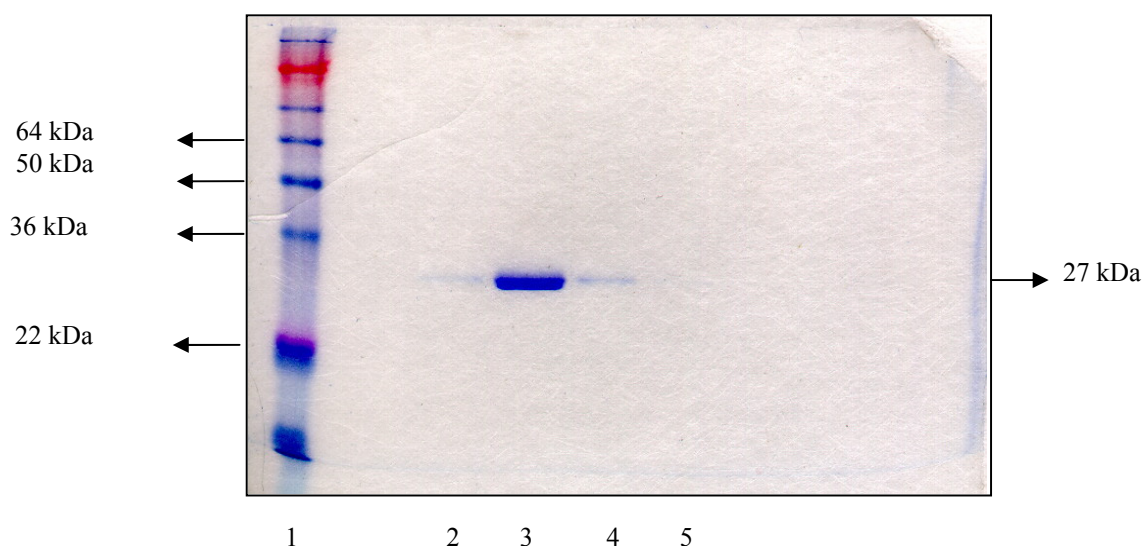


**Abb. 1:** Nachweis Beta2-spezifischen polyklonalen Mäuseserums im Immunoblot

1:	Marker See Blue <sup>TM</sup> Plus2 <sup>®</sup> (12 µl)	
2:	pAk-Serum Maus I	1 : 20
3:	-“-	1 : 500
4:	-“-	1 : 1000
5:	pAk-Serum Maus II	1 : 20
6:	-“-	1 : 500
7:	-“-	1 : 1000
8:	Negativ Kontrolle: Null-Serum	1 : 10
9:	Negativ Kontrolle: PBS-Tween	

## 4.2 Nachweis der fraktionierten Elution des Beta2-Toxins in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Ausbeute an rBeta2-Toxin betrug nach affinitätschromatographischer Aufreinigung im Durchschnitt 209,2 µg/l Expressionskultur. Die Spuren 2 bis 5 stellen die vier Elutionsfraktionen nach affinitätschromatographischer Aufreinigung dar. Bei der fraktionierten Elution des rBeta2-Toxins mittels Desthiobiotin, von der Strep-Tactin-Matrix, ließ sich das 27 kDa große Toxin in den Fraktionen 2, 3 und 4 nachweisen (Abb. 2), wobei die Ausbeute in Fraktion 2 (Spur 3) am höchsten war.

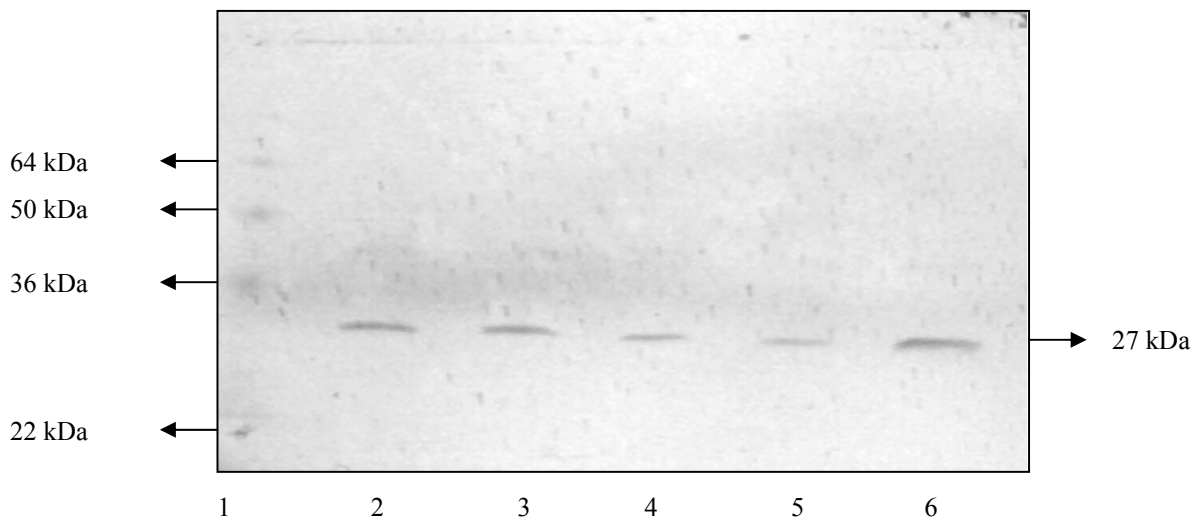


**Abb. 2:** Nachweis des fraktionierten Eluates rBeta2-Toxins nach affinitätschromatographischer Aufreinigung in der SDS-Gelelektrophorese (12,5%-iges SDS-Gel, Coomassie-Färbung)

- 1: Marker See Blue™ Plus2® (12 µl)
- 2: Fraktion 1 (rβ2 10 µl)
- 3: Fraktion 2 (rβ2 10 µl)
- 4: Fraktion 3 (rβ2 10 µl)
- 5: Fraktion 4 (rβ2 10 µl)

### 4.3 Nachweis des nativen Beta2-Toxins in *C. perfringens* – Kulturüberständen mittels Beta2-spezifischen polyklonalen Serums von der Maus

Um die Frage zu klären, ob Beta2-toxinogene *C. perfringens*-Feldisolate ein korrespondierendes Protein in den Kulturüberstand sezernieren und dieses mit einem polyklonalen Serum, das nach Immunisierung von Mäusen mit dem rekombinanten Beta2-Toxin gewonnen wurde, detektiert werden können, wurden insgesamt 50 *C. perfringens*-Stämme im Immunoblot überprüft. Die Ergebnisse sind für 5 Feldisolate exemplarisch in Abb. 3 dargestellt. Die Spuren 2 – 6 zeigen ein deutliches Signal in dem für das Beta2-Toxin erwarteten Molekulargewichtsbereichs von ca. 27 kDa. Eine Kreuzreaktivität des Beta2-spezifischen polyklonalen Mäuseserums mit anderen Proteinen des *C. perfringens* Kulturüberstandes ist nicht vorhanden. Damit wird der Beweis geführt, dass sich das rBeta2-Hyperimmunserum für die Detektion von nativem Beta2 in Kulturüberständen eignet.



**Abb. 3: Nachweis des Beta2-Toxins in *C. perfringens* Kulturüberständen mit Beta2-spezifischem polyklonalem Mäuseserum (Immunoblot)**

1:	Marker See Blue <sup>TM</sup> Plus 2 <sup>®</sup>	(12 µl)
2:	P 8862/00	<i>C. perfringens</i> Typ A (8,8 µg)
3:	P 8861/00	-"-
4:	P 8142/00	-"-
5:	IDT 99/00	-"-
6:	IDT 145/00	-"-

#### 4.3.1 Prozentuale Verteilung Beta2-positiver Typ A- und Typ C-Kulturüberstände von Beta2-Toxigen positiven Isolaten

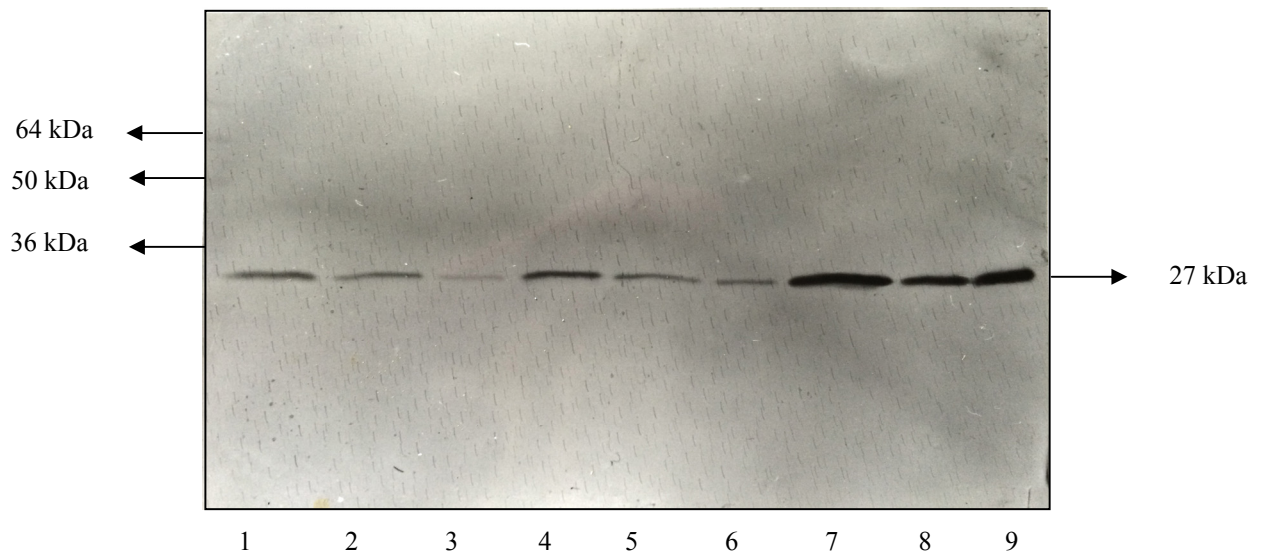
Der mittels Immunoblot geführte Nachweis des Beta2-Toxins von insgesamt 50 *C. perfringens*-Kulturüberständen ergab, dass von den untersuchten Typ A-Isolaten 87,5 % ein Beta2-Toxin in den Kulturüberstand exprimieren. Innerhalb der Typ C-Stämme war nur in 40 % phänotypisch das Beta2-Toxin im Kulturüberstand nachweisbar (Tabelle 9). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass nicht grundsätzlich jeder genotypisch positive *C. perfringens*-Stamm ein Beta2-Toxin in den Kulturüberstand exprimiert und nur eine Genotypisierung der Stämme mittels PCR alleine nicht ausreicht, um Beta2-positive Feldisolate zu identifizieren.

**Tab. 9: Ermittelte prozentuale Verteilung Beta2-exprimierender Typ A- und Typ C-Isolate**

<i>C. perfringens</i> -Toxovar (n)	Anzahl positiver Stämme im Beta2-Toxinnachweis- system (%)	Anzahl negativer Stämme im Beta2-Toxinnachweis- system (%)
A (40)	87,5	12,5
C (10)	40	60

#### 4.3.2 Quantitative Bestimmung der Toxinbildung des Beta2-Toxins aus *C. perfringens*-Kulturüberständen im Immunoblot

Um zu prüfen, ob Beta2-positive *C. perfringens*-Feldisolate unterschiedlich hohe Mengen an Beta2-Toxin in den Kulturüberstand exprimieren, wurden abfallende Konzentrationen von Kulturüberständen verschiedener Feldisolate im Immunoblot untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Stämme unterschiedlich stark Beta2-Toxin in den Kulturüberstand sezernieren. Die schwächste Expression ist für den Typ A-Stamm IDT 17/00 (Abb. 4, Spur 1 – 3) nachweisbar, gefolgt vom Stamm IDT 18/00. Die stärkste Expression zeigt der Stamm P 8141/00 (Abb. 4, Spur 7 – 9). Somit muss zwischen gering-, mittel- und hochgradig toxinogenen *C. perfringens*-Stämmen unterschieden werden.

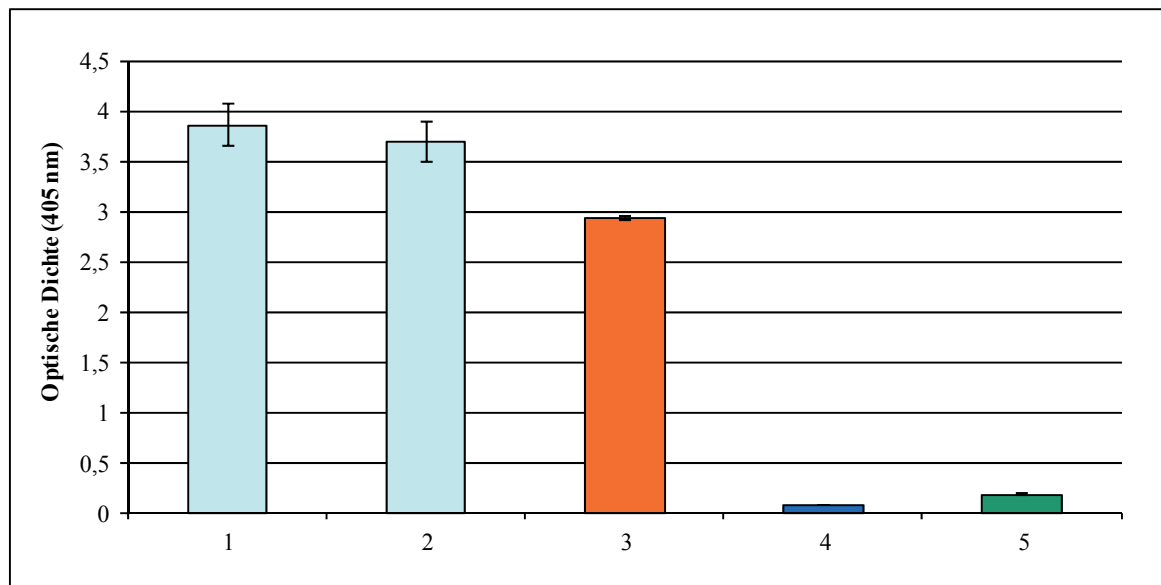


**Abb. 4:**                      **Ermittelte Expressionsmenge des Beta2-Toxins in *C. perfringens*-Kulturüberständen (Immunoblotverfahren)**

1:	IDT 17/00	<i>C. perfringens</i> Typ A (10 µg)
2:	-“-	-“- (5 µg)
3:	-“-	-“- (2,5 µg)
4:	IDT 18/00	-“- (10 µg)
5:	-“-	-“- (5 µg)
6:	-“-	-“- (2,5 µg)
7:	P 8141/00	-“- (10 µg)
8:	-“-	-“- (5 µg)
9:	-“-	-“- (2,5 µg)

#### 4.4. Bestimmung Beta2-spezifischer Antikörper im Kaninchenserum

Die polyklonalen Kaninchenseren, die nach Immunisierung mit dem rBeta2-Toxin gewonnen wurden, wurden im ELISA auf Reaktivität gegenüber dem Beta2-Toxin geprüft (Abbildung ): Säule 1 und 2 zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung zweier Beta2-spezifischer aus unterschiedlichen Tieren gewonnener Hyperimmunseren.

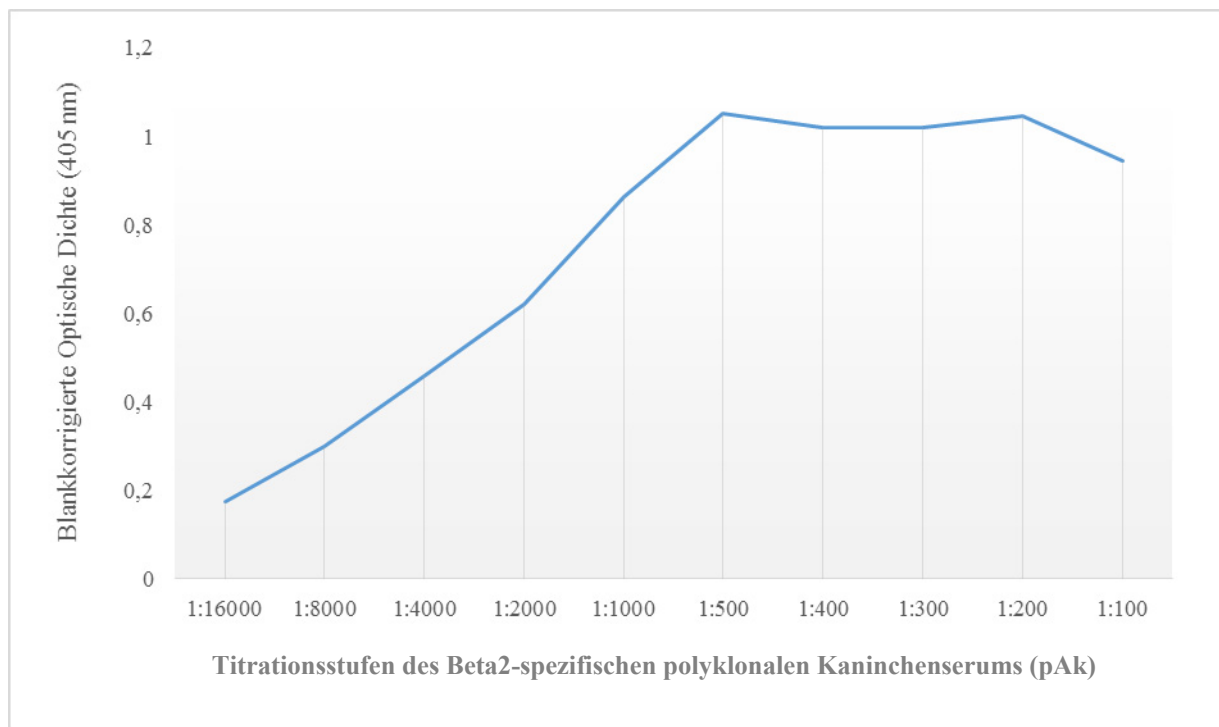


**Abb. 5: Nachweis Beta2-Toxin erkennender Antikörper im ELISA**

- 1: Anti-Beta2-Kaninchenserum Tier 1
- 2: Anti-Beta2-Kaninchenserum Tier 2
- 3: Positivkontrolle (0,5 µg rBeta2 und mAk 2-4A5)
- 4: Negativkontrolle (0,5 µg rBeta2)
- 5: Blank (pAk-Kaninchen)

#### 4.4.1 Optimale Menge des Nachweisantikörpers (Beta2-spezifisches Serum vom Kaninchen) im Capture-ELISA

Um die optimale Menge des Anti-Beta2-Kaninchenserums als Nachweisantikörper im Capture-ELISA zu ermitteln, wurde das Serum in log-2-Verdünnung bis 1 : 16.000 austitriert (Abb. 6). Eine Serumsverdünnungsstufe von 1 : 500 erwies sich dabei als am besten geeignet, um Meßwerte sowohl von gering- als auch hochgradig Beta2-Toxin produzierenden *C. perfringens*-Isolaten im Photometer noch darzustellen.



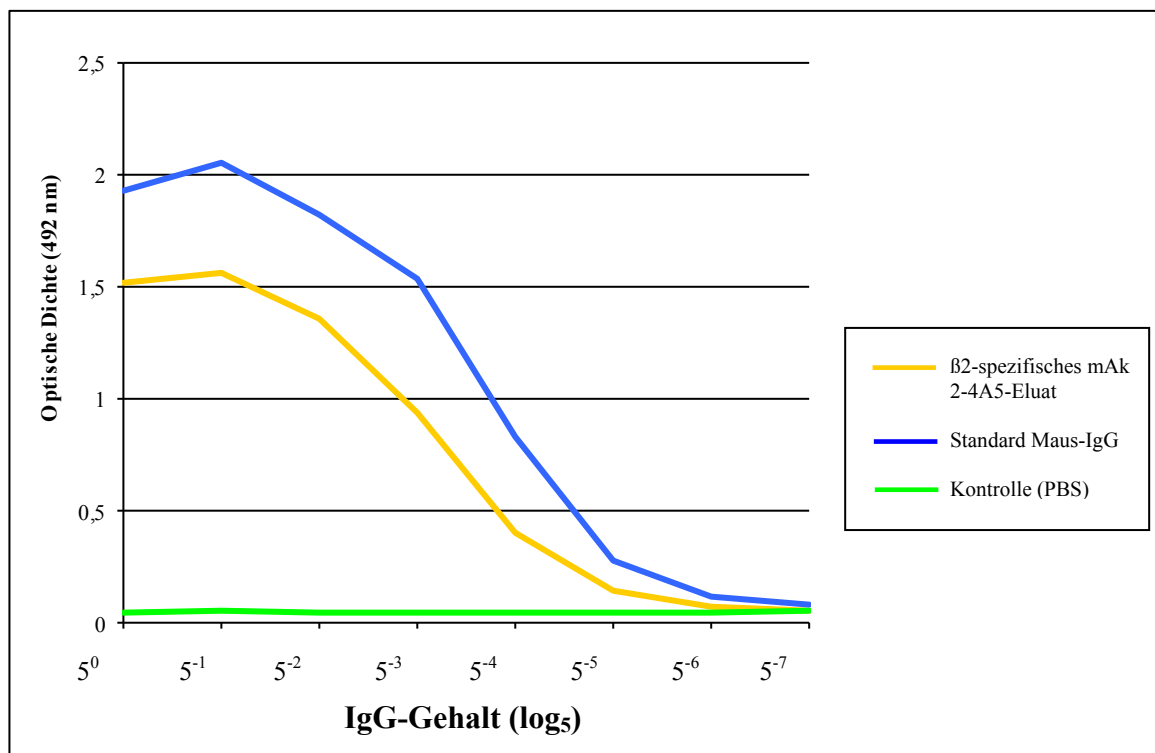
**Abb. 6:** Ermittlung der optimalen Menge an Nachweisantikörper (Beta2-spezifisches Serum vom Kaninchen) im Capture-ELISA

## 4.5 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

### 4.5.1 Epitopspezifität, Immunglobulinsubklassen und Reinheitsgrad

Um die Frage zu klären, ob die mAk 2-4A5 und 2-4C11 unterschiedliche Epitope auf dem Beta2-Toxinmolekül erkennen, wurde ein spezifischer Epitop-ELISA (3.12) durchgeführt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass beide Antikörper unterschiedliche Epitope auf dem Molekül binden und keine Kompetition beider Antikörper um ein gemeinsames Epitop stattgefunden hat.

Mittels des mouse-monoclonal-antibody-isotyping-kit (Best. Nr.1493027; Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) waren die Beta2-spezifischen monoklonalen Antikörper mAk 2-4A5 und 2-4C11 der Ig-Klasse G1 zuzuordnen mit jeweils 2 leichten Ketten vom kappa-Typ. In einem Maus-IgG-ELISA wurde, anhand eines Standard-Maus-IgG als Eichkurve, die Ausbeute der aufgereinigten Beta2-spezifischen IgG1 bestimmt (3.10.10). In der Abb. 7 ist dieses beispielhaft am mAk 2-4A5 dargestellt. Aus 200 ml Hybridomaüberstand ließen sich im Mittel ca. 1084 µg des Beta2-spezifischen mAk 2-4A5 und ca. 530 µg des Beta2-spezifischen mAk 2-4C11 durch affinitätschromatographischer Aufreinigung gewinnen.

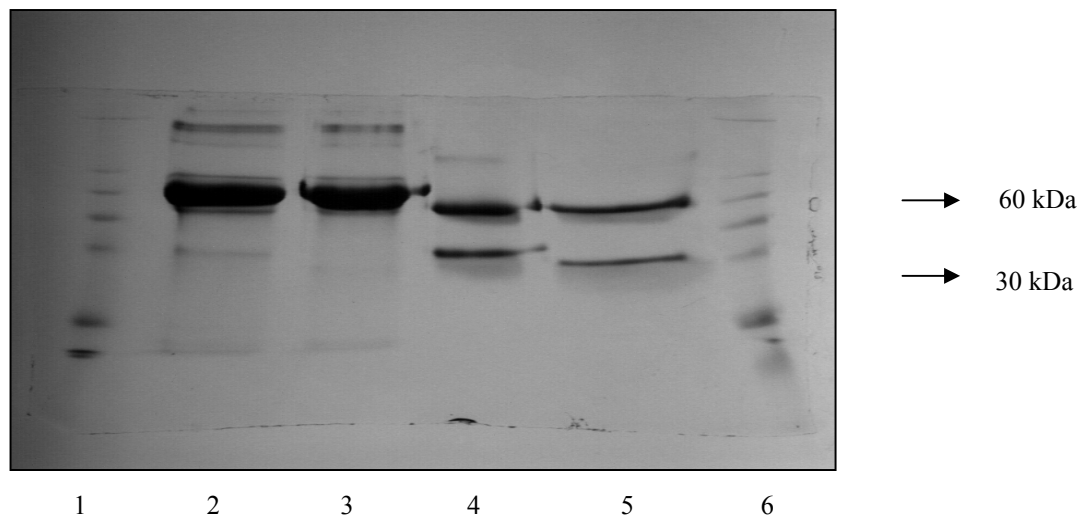


**Abb. 7:** Darstellung des IgG des aufgereinigten mAk 2-4A5 - Konzentration (ELISA)



Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der monoklonalen Antikörper nach affinitätschromatographischer Aufreinigung wurden definierte Konzentrationen aufgereinigter monoklonaler Antikörper sowie der unaufgereinigte Hybridomaüberstand aus der Massenproduktion SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die Spur 4 und 5 in Abb. 8 zeigen den Aufreinigungsgrad der mAk 2-4A5 und 2-4C11. Die schweren Ketten der aufgereinigten mAk stellen sich als Doppelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa, die leichten Ketten als Doppelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa dar.



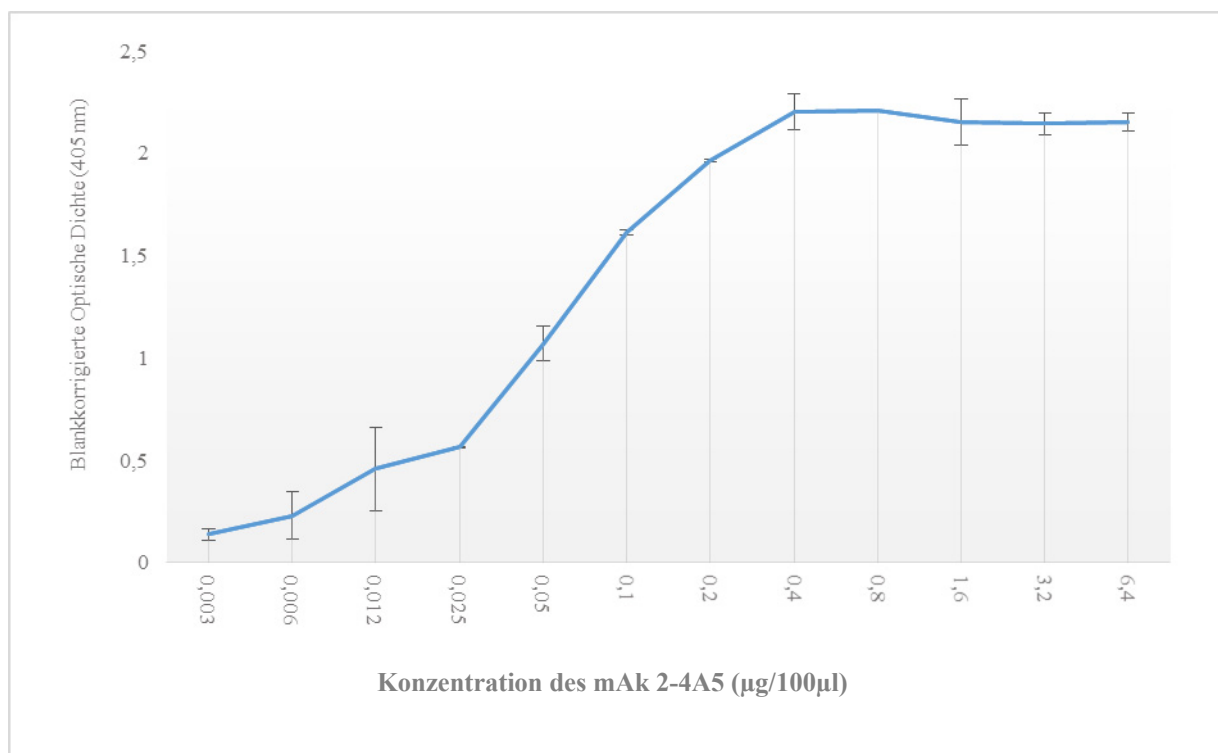
**Abb. 8:**                    **Darstellung des Reinheitsgrades nach affinitätschromatographischer Aufreinigung der mAk 2-4A5 und 2-4C11 (SDS-Gelelektrophorese, 12,5%-ig, Coomassie-Färbung)**

- 1:                    Marker See Blue™ Plus2®
- 2:                    unaufgereinigter mAk 2-4A5
- 3:                    unaufgereinigter mAk 2-4C11
- 4:                    aufgereinigter mAk 2-4A5
- 5:                    aufgereinigter mAk 2-4C11
- 6:                    Marker See Blue™ Plus2®

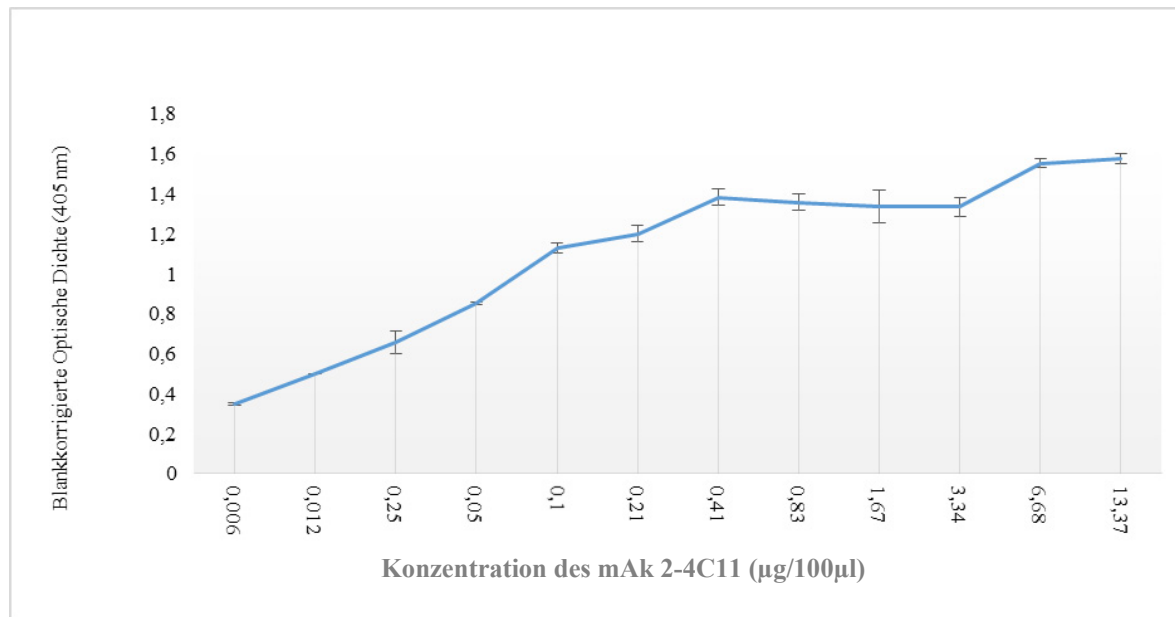
## 4.6 Etablierung des Beta2-spezifischen Capture-ELISAs

### 4.6.1 Bestimmung der optimalen Konzentration des Fangantikörpers

Zum Nachweis der optimalen Bindungskapazität von Nunc-Maxisorp-Platten<sup>®</sup> für die mAks 2-4A5 und 2-4C11 wurden die mAks jeweils im Doppelansatz in log<sub>2</sub>-Stufen titriert. Abbildungen 9 und 10 zeigen, dass ab einer Konzentration von 0,4 µg/100 µl für den mAk 2-4A5 und 2-4C11 die Bindungskapazität auf Nunc-Maxisorp-Platten<sup>®</sup> erreicht ist.



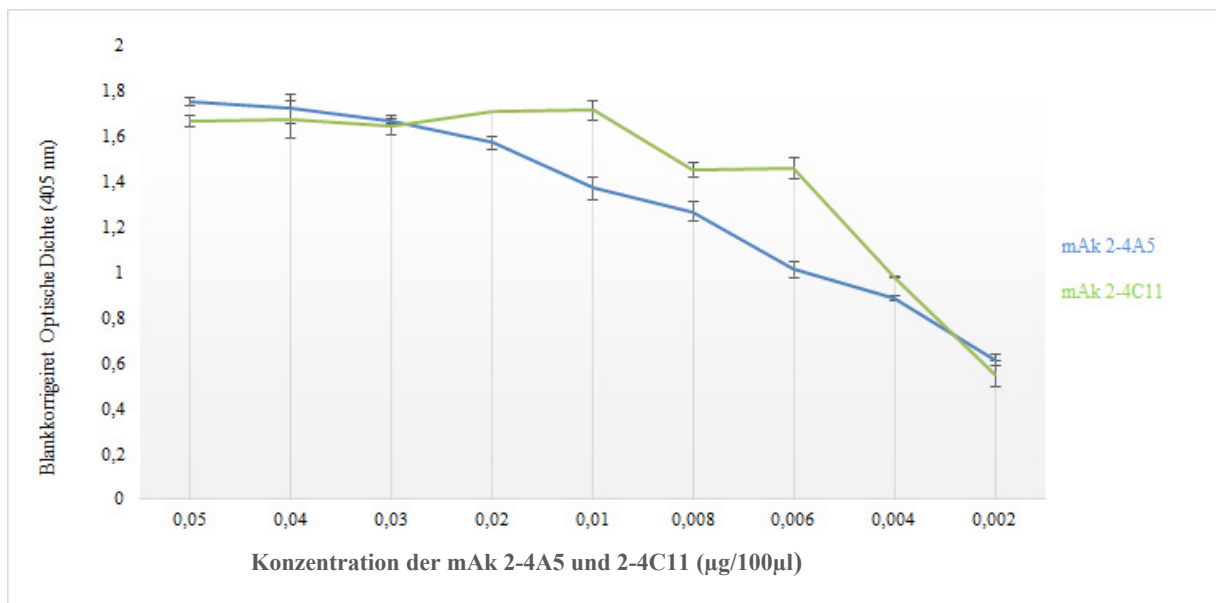
**Abb. 9:** Nachweis der maximalen Bindungskapazität der Nunc-Maxisorp-Platten<sup>®</sup> für den mAk 2-4A5



**Abb. 10:** Nachweis der maximalen Bindungskapazität der Nunc-Maxisorp-Platten® für den mAk 2-4C11

#### 4.6.2 Nachweisgrenze der monoklonalen Antikörper 2-4A5 und 2-4C11 auf Nunc-Maxisorp-Platten®

Um zu prüfen, bei welcher Konzentration der mAk 2-4A5 und 2-4C11 die Bindungsstellen des rBeta2-Toxin sättigt, wurden die mAk in  $\log_2$ -Stufen auf eine mit  $0,5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  rBeta2-Toxin beschichtete Nunc-Maxisorp-Platte® ausstitriert. Die Ergebnisse (Abb. 11) zeigen, dass bei dem mAk 2-4A5  $0,03 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  bzw. mAk 2-4C11  $0,1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  spezifischer Antikörper ausreichen, um alle Bindungsstellen auf dem rBeta2-Toxin abzusättigen.



**Abb. 11:** Ermittelte Konzentration an mAk 2-4A5 und 2-4C11 zur Sättigung aller Bindungsstellen des rBeta2-Toxins

#### 4.6.3 Aufbau des Beta2-spezifischen Capture-ELISAs

Der neu entwickelte Beta2-spezifische Fangantikörper-ELISA ist nach dem Prinzip eines sogenannten Capture-ELISAs aufgebaut.

0,4 µg mAk 2-4A5 bzw. 0,4 µg mAk 2-4C11 werden in jeweils 100 µl Coatingpuffer auf eine Mikrotiterplatte (NUNC-Maxisorp, Fa. Nunc, Wiesbaden) pipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend werden die Platten dreimal für jeweils 5 Minuten mit 200 µl Waschpuffer (1 x PBS, 0,05% Tween, pH 7,2) bei Raumtemperatur gewaschen. Das Blocken freier Bindungsstellen erfolgt mittels eines mit A. bidest 1 : 10 verdünnten Pepton-Blockpuffers (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Anschließend wird für 45 Minuten bei 37°C auf einer Wippe inkubiert und es folgt das dreimalige Waschen für jeweils 5 Minuten. Als nächstes folgt die Inkubation mit dem jeweils unbekannten *C. perfringens*-Kulturüberstand, 200 µl/„well“, für 1 h bei 37°C auf einer Wippe. Daran schliessen sich das dreimalige Waschen, wie oben beschrieben, und die Immundekoration mit dem polyklonalen Antikörperserum vom Kaninchen (100 µl/Vertiefung) in der Konzentration 1 : 500 an. Die Mikrotiterplatte wird auch hier für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Zum Nachweis gebundener Antikörper wird ein 1 : 2000 in 1 x PBS (pH 7,4) verdünntes Anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat (Fa. Amersham, Freiburg) verwendet. Es werden 100 µl des Konjugates pro Plattenvertiefung pipettiert, gefolgt von einer erneuten einstündigen Inkubation bei 37°C auf einer Wippe und einem letzten Waschschrift. Sodann werden 100 µl einer 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfinic Acid) (ABTS)-Substratlösung (5 mg ABTS [Fa. Serva, Heidelberg] in 10 ml Substratpuffer [20 mM Na-Citrat/PBS pH 4,2] + 5 µl 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung [Fa. Merck, Darmstadt]) pro „well“ pipettiert. Die Titerplatte wird für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und bei einer Wellenlänge von 405 nm die Extinktion in einem Titertek-Multiscan Photometer ermittelt.

Als Positivkontrolle werden 0,5 µg des rekombinanten Beta2-Toxins im Doppelansatz eingesetzt. Bei den Negativkontrollen erfolgt die Immundekoration immer mit 100 µl Waschpuffer im Doppelansatz. Die Beschichtung der „wells“ mit der Blank-Kontrolle findet im Doppelansatz mit 100 µl 1 x PBS (pH 7,4) statt. Die Immundekoration erfolgt mit dem polyklonalen Serum vom Kaninchen. In Abbildung 12 und 13 sind die schematische Darstellung und die Durchführung des Beta2-spezifischen Capture-ELISAs mittels Fließdiagramm dargestellt.

Nunc-Maxisorp-Platte (0,3 µg mAk 2-4A5/100 µl Coatingpuffer)  
(0,4 µg mAk 2-4C11/100 µl Coatingpuffer)

Inkubation bei 4°C über Nacht

Waschen mit PBS-Tween, 3 x 5 Minuten

Blocken mit Pepton (1 : 10) (200 µl/well)

Inkubation bei 37°C für 45 Minuten

Waschen mit PBS-Tween, 3 x 5 Minuten

Inkubation mit 200 µl Bakterienkulturüberstand

Inkubation bei 37°C für 1 h

Waschen mit PBS-Tween, 3 x 5 Minuten

Immundekoration von 100 µl pAK-Kaninchen (1:500)

Inkubation bei 37°C für 1 h

Waschen mit PBS-Tween, 3 x 5 Minuten

Dekoration mit Anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat (1 : 2000) (100 µl/well)

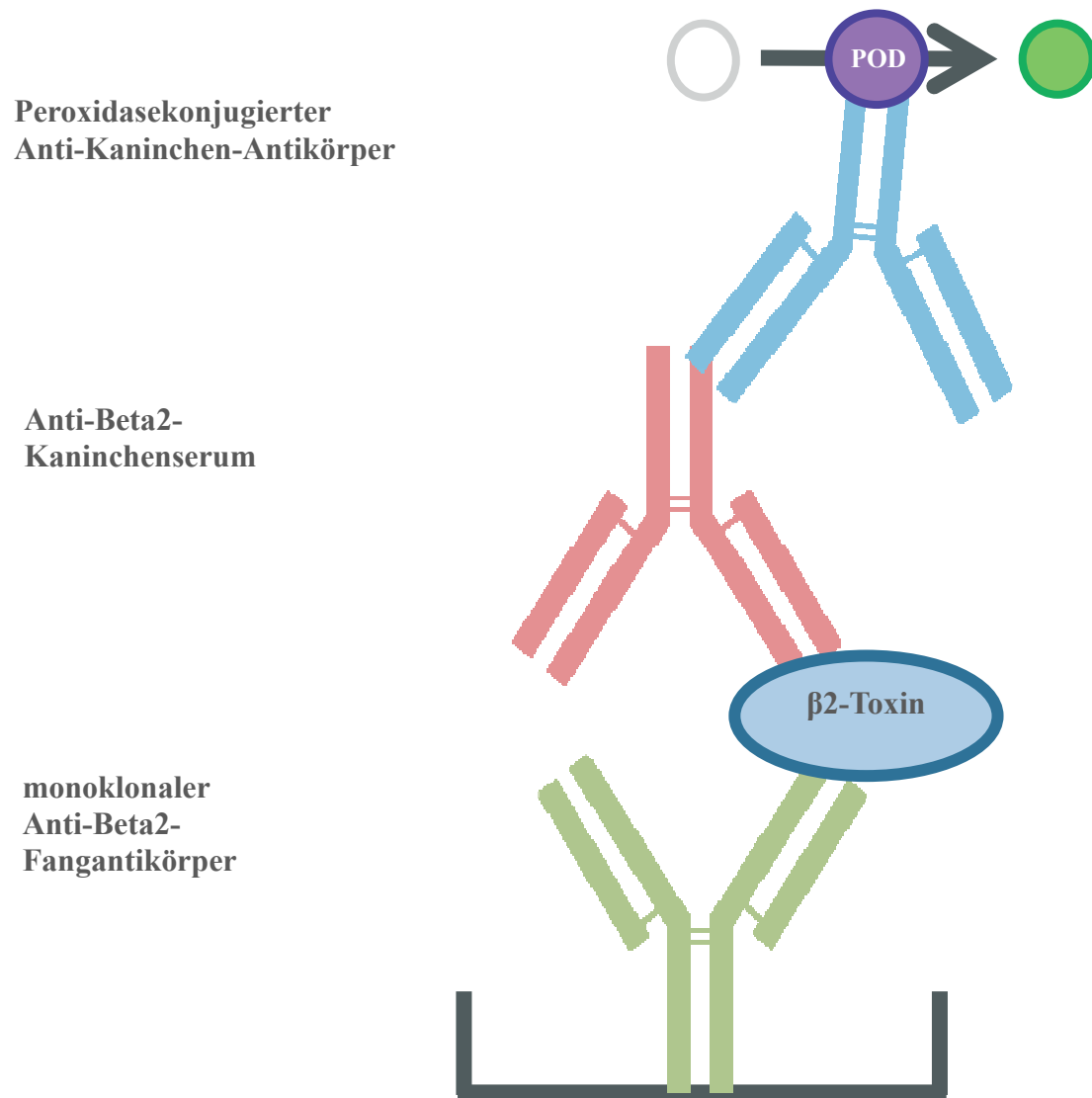
Inkubation bei 37°C für 1 h

Waschen mit PBS-Tween, 3 x 5 Minuten

Anfärbung mit 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> & 2 ml ABTS (5 mg/10 ml (100 µl/well)

---

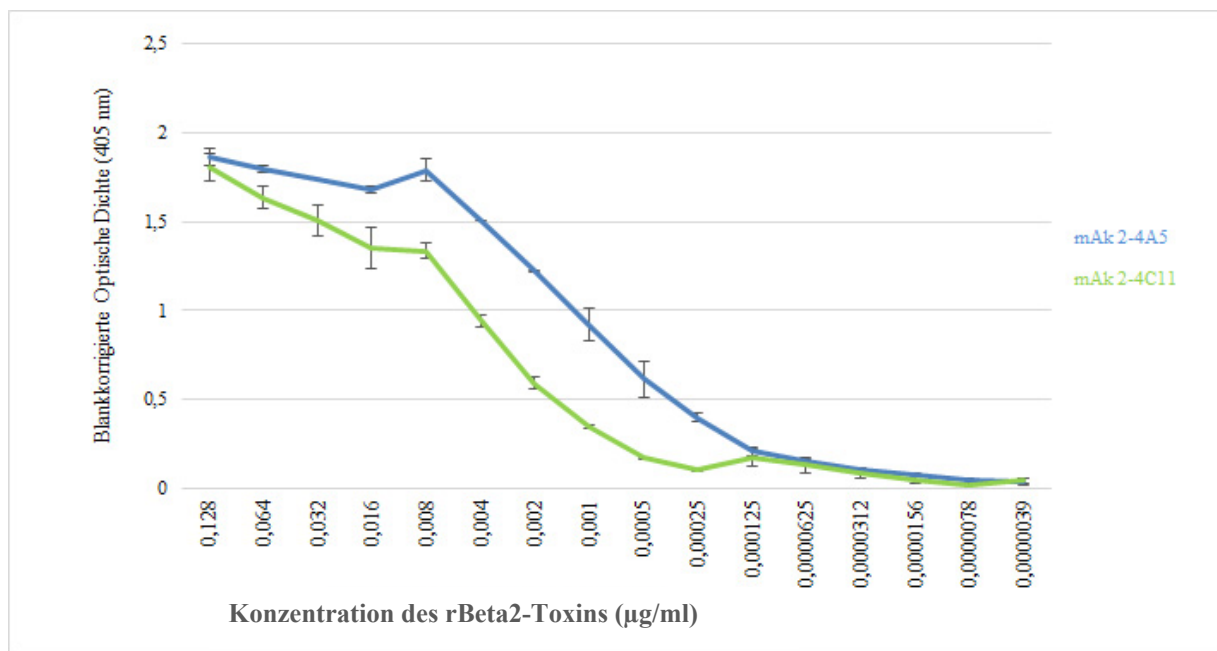
**Abb. 12:**     **Überblick des detaillierten Aufbaus des Beta2-spezifischen Capture-ELISAs**



**Abb. 13:** Schematischer Aufbau des Capture-ELISA

#### 4.6.4 Nachweisgrenze für das rekombinante Beta2-Toxin im Capture-ELISA

Beginnend mit einer Konzentration von 0,128 µg/ml, in  $\log_2$ -Schritten, ließ sich das austitrierte rBeta2-Toxin mittels mAk 2-4A5 als Fangantikörper bis zu einer Konzentration von 0,00025 µg/ml und mittels mAk 2-4C11 als Fangantikörper bis zu einer Konzentration von 0,001 µg/ml nachweisen. Als Nachweisgrenze wurde der kleinste Meßwert nach Abzug der Hintergrundbindung plus 3-facher Standardabweichung festgelegt.



**Abb. 14:** Nachweisgrenzen des rekombinanten Beta2-Toxins mittels der mAk 2-4A5 und 2-4C11 im Capture-ELISA



#### 4.6.5 Intra-Assay-Präzision

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Präzision wurde der Kulturüberstand von *C. perfringens* 3866/04 achtmal in der gleichen Testplatte eingesetzt, um so die Varianz der Ergebnisse innerhalb eines Testansatzes zu prüfen. Die Intra-Test-Präzision sollte einen Variationskoeffizienten von < 20 % erreichen, denn nur dann ist eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gegeben. Für beide mAk wurde dieser Test insgesamt viermal wiederholt.

Die Intra-Assay-Varianz im vorliegenden Test betrug für den mAk 2-4A5 im Mittel 10,78% und für den mAk 2-4C11 im Mittel 9,31%.

Damit ist die Intra-Assay-Präzision für den Beta2-spezifischen Capture-ELISA bestätigt.

**Tab. 10: Intra-Assay-Präzision des Capture-ELISAs mit den mAk 2-4A5 und 2-4C11**

		<u>Mittelwert</u>	<u>Standardabweichung</u>	<u>Variationskoeffizient</u>
<b>mAk 2-4A5:</b>				
Platte 1	$\Sigma$	$\bar{x}$ 0,827	$\bar{s}$ 0,0717	VK 8,66 %
Platte 2	$\Sigma$	$\bar{x}$ 0,715	$\bar{s}$ 0,0765	VK 10,69 %
Platte 3	$\Sigma$	$\bar{x}$ 0,743	$\bar{s}$ 0,0850	VK 11,4 %
Platte 4	$\Sigma$	$\bar{x}$ 0,928	$\bar{s}$ 0,1150	VK 12,39 %
Mittelwert:				10,78%
<b>mAk 2-4C11:</b>				
Platte 1	$\Sigma$	$\bar{x}$ 0,844	$\bar{s}$ 0,1006	VK 11,91 %
Platte 2	$\Sigma$	$\bar{x}$ 0,529	$\bar{s}$ 0,0320	VK 6,04 %
Platte 3	$\Sigma$	$\bar{x}$ 0,598	$\bar{s}$ 0,0202	VK 3,37 %
Platte 4	$\Sigma$	$\bar{x}$ 0,721	$\bar{s}$ 0,1150	VK 15,95 %
Mittelwert:				9,31%

#### 4.6.6 Inter-Assay-Präzision

Zur Bestimmung der Inter-Assay-Präzision, das heißt des Grades der Reproduzierbarkeit an verschiedenen Meßtagen, wurde der verwendete *C. perfringens*-Kulturüberstand (3866/04) zu unterschiedlichen Zeitpunkten in verschiedenen Testplatten geprüft. So wurde die Varianz der Ergebnisse des Testsystems zwischen den einzelnen Testansätzen ermittelt. Die Inter-Assay-Präzision sollte ebenso wie die Intra-Assay-Präzision einen Variationskoeffizienten < 20 % ergeben. Hieraus ergab sich ein Mittelwert für den mAk 2-4A5 von 14,87% und für den 2-4C11 mAk von 14,15%.

**Tab. 11: Inter-Assay-Präzision des Capture-ELISAs mit dem IgG<sub>1</sub> 2-4A5 hinsichtlich unterschiedlicher Zeitpunkte (achtmalige Testung; Tag 1)**

<u>Platten-Nr.</u>	<u>Stamm</u>	<u>Mittelwert (OD)</u>	<u>Standardabweichung</u>
Platte 1	3866/04	0,827	0,0717
Platte 2	-“-	0,715	0,0765
Platte 3	-“-	0,743	0,0850
Platte 4	-“-	0,928	0,0915
		$\Sigma \quad \bar{x} \quad 0,803$	$\bar{s} \quad 0,0811 \quad \text{VK} \quad 10,09\%$

**Tab. 12: Inter-Assay-Präzision des Capture-ELISA's mit dem IgG<sub>1</sub> 2-4C11 hinsichtlich unterschiedlicher Zeitpunkte (achtmalige Testung; Tag 1)**

<u>Platten-Nr.</u>	<u>Stamm</u>	<u>Mittelwert (OD)</u>	<u>Standardabweichung</u>
Platte 1	3866/04	0,844	0,1006
Platte 2	-“-	0,592	0,0320
Platte 3	-“-	0,598	0,0860
Platte 4	-“-	0,721	0,1150
		$\Sigma \quad \bar{x} \quad 0,689$	$\bar{s} \quad 0,0834 \quad VK \quad 12,10 \%$

**Tab. 13: Inter-Assay-Präzision des Capture-ELISA's mit dem IgG<sub>1</sub> 2-4A5 hinsichtlich unterschiedlicher Zeitpunkte (achtmalige Testung; Tag 2)**

<u>Platten-Nr.</u>	<u>Stamm</u>	<u>Mittelwert (OD)</u>	<u>Standardabweichung</u>
Platte 1	3866/04	0,478	0,0311
Platte 2	-“-	0,657	0,2150
Platte 3	-“-	0,541	0,1583
Platte 4	-“-	0,766	0,0759
		$\Sigma \quad \bar{x} \quad 0,611$	$\bar{s} \quad 0,1200 \quad VK \quad 19,64 \%$

**Tab. 14: Inter-Assay-Präzision des Capture-ELISAs mit dem IgG1 2-4C11 hinsichtlich unterschiedlicher Zeitpunkte (achtmalige Testung; Tag 2)**

Platten-Nr.	Stamm	Mittelwert (OD)	Standardabweichung
Platte 1	3866/04	0,469	0,0489
Platte 2	-“-	0,527	0,0718
Platte 3	-“-	0,348	0,0425
Platte 4	-“-	0,505	0,1360
		$\Sigma \quad \bar{x} \quad 0,462$	$\bar{s} \quad 0,0748 \quad VK \quad 16,19 \%$

#### 4.6.7 Sensitivität des Capture-ELISAs

Um die Sensitivität des Beta2-spezifischen Capture-ELISAs zu prüfen, wurden Kulturüberstände von 18 *C. perfringens*-Feldisolaten untersucht. Alle 18 *C. perfringens*-Feldisolate waren in der Beta2-spezifischen PCR positiv und zeigten im Capture-ELISA und im Immunoblotverfahren eine spezifische Reaktivität gegenüber dem Beta2-Toxin von *C. perfringens*. Der Capture-Elisa als Nachweismethode für das Beta2-Toxin weist eine 100%ige Sensitivität auf, das heißt alle Beta2-Toxigen-positive Stämme sind mit dem Capture-ELISA nachweisbar.

**Tab. 15: Bestimmung der Sensitivität des Beta2-spezifischen Capture-ELISA anhand von 18 Kulturüberständen**

<u>C. perfringens</u> -Feldisolat	PCR	Westernblot	Capture-ELISA	
		pAk	mAk 2-4A5	mAk 2-4C11
IDT 17/00	+	+++ <sup>3)</sup>	+	+
IDT 18/00	+	+++	+	+
P 2045/1/00	+	++ <sup>2)</sup>	+	+
P 2045/2/00	+	++	+	+
P 5655/99	+	++	+	+
P 8169/00	+	++	+	+
P 2046/00	+	+ <sup>1)</sup>	+	+
P 8862/00	+	++	+	+
P 8861/00	+	++	+	+
IDT 38/00	+	-	+	+
IDT/MB 1508	+	++	+	+
P 776/01	+	+	+	+
IDT 142/00	+	++	+	+
IDT 148/00	+	+++	+	+
IDT/MB 1454	+	++	+	+
IDT 1492	+	-	+	+
IDT/MB 1499	+	+	+	+
IDT/FLB 28/00	+	+	+	+
+ = positiv                      Westernblot:    1)    geringgradig positiv    2)    mittelgradig positiv - = negativ                      3)    hochgradig positiv				

#### 4.6.8 Spezifität des Capture-ELISAs

Zur Überprüfung der Spezifität des Capture-ELISAs wurden Kulturüberstände anderer Clostridienspezies (*C. bifermentans*, *C. septicum*, *C. perfringens* Typ A), grampositive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Sc. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*) und gramnegative Keime (*E. coli* O147:K89 und O149:K91, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*) untersucht. Alle 11 Bakterienstämme zeigten in der PCR und im Capture-ELISA keine Reaktivität gegenüber dem Beta2-spezifischen monoklonalen Antikörper. Damit zeigt der Capture-ELISA eine 100%-Spezifität auf, das heißt alle „nicht Beta2-positiven“ Kulturüberstände werden im ELISA als „nicht positiv“ eingestuft.

**Tab. 16: Nachweis der Spezifität des Beta2-spezifischen Capture-ELISAs anhand von Stämmen anderer Bakterienarten**

<u>Bakterienstämme</u>	<u>PCR</u>	<u>Capture-ELISA</u>	
		<u>mAk 2-4A5</u>	<u>mAk 2-4C11</u>
Positivkontrolle (rBeta2)	n.z.	+	+
Positivkontrolle (IDT 18/00)*	+ <sup>1)</sup>	+	+
<i>Clostridium bifermentans</i>	- <sup>2)</sup>	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i> (Typ A)	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-
<i>Sc. dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i>	-	-	-
<i>E. coli</i> (O147:K89)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O149:K81)	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas vulgaris</i>	-	-	-

n. z. nicht zu zuordnen

\* Beta2-Toxigen positiver *C. perfringens*-Typ A

1)

positiv

2)

negativ

#### 4.6.9 Untersuchung von *C. perfringens*-Kulturüberständen aus Kotproben von gesunden und kranken Saugferkeln mittels Beta2-spezifischen Capture-ELISAs

Durch die vergleichende Untersuchung von Kotproben gesunder und kranker Saugferkel sollte festgestellt werden, ob in Kulturüberständen von *C. perfringens*-Feldisolaten das Beta2-Toxin im Capture-ELISA nachweisbar ist und Unterschiede in der Höhe der Expressionsrate zu finden sind. Hierzu wurden Ammoniumsulfat-gefällte Kulturüberstände von Beta2-Gen-positiven *C. perfringens*-Stämmen im Capture-ELISA zu verschiedenen Zeitpunkten eingesetzt und untersucht.

Die Tabellen 17 bis 20 zeigen, dass in Kulturüberständen von *C. perfringens*-Feldisolaten das Beta2-Toxin nachweisbar ist und geben Hinweise darauf, dass bei erkrankten Tieren eine starke Expression des Beta2-Toxins stattfindet. Sowohl bei Verwendung des mAk 2-4A5, wie auch beim mAk 2-4C11, ist die Expression des Beta2-Toxins bei den kranken Tieren fünffach höher als bei gesunden Tieren.

**Tab. 17: Beta2-Toxin-Gehalt in Kulturüberständen aus Kotproben von *C. perfringens*-Isolaten von gesunden und kranken Ferkeln mit dem mAk 2-4A5 (Tag 1)**

Isolate aus Kotproben gesunder Ferkel	$\bar{x}^{1)}$	$\bar{s}$	Isolate aus Kotproben kranker Ferkel	$\bar{x}^{1)}$	$\bar{s}$
P 8379/01	0,077	0,0042	P 2046/00	0,582	0,0296
P 8044/01	0,077	0,0021	IDT 142/00	0,484	0,0318
P 7964/01	0,133	0,0141	3866/04	0,481	0,0728
P 6901/01	0,141	0,0091	3878/04	0,511	0,0063

1) Optische Dichte

$\Sigma$   $\bar{x}$  0,107  $\bar{s}$  0,0074  $\bar{x}$  0,514  $\bar{s}$  0,0351

**Tab. 18: Beta2-Toxin-Gehalt in Kulturüberständen aus Kotproben von *C. perfringens*-Isolaten von gesunden und kranken Ferkeln mit dem mAk 2-4C11(Tag 1)**

Isolate aus Kotproben gesunder Ferkel	$\bar{x}^{1)}$	$\bar{s}$	Isolate aus Kotproben kranker Ferkel	$\bar{x}^{1)}$	$\bar{s}$
P 8379/01	0,074	0,0014	P 2046/00	0,492	0,0756
P 8044/01	0,075	0,0042	IDT 142/00	0,342	0,0042
P 7964/01	0,103	0,0028	3866/04	0,318	0,1414
P 6901/01	0,117	0,0014	3878/04	0,485	0,0007

1) Optische Dichte

$\Sigma$   $\bar{x}$  0,092  $\bar{s}$  0,0025  $\bar{x}$  0,409  $\bar{s}$  0,0555

**Tab. 19: Beta2-Toxin-Gehalt in Kulturüberständen aus Kotproben von *C. perfringens*-Isolaten von gesunden und kranken Ferkeln mit dem mAk 2-4A5 (Tag 2)**

Isolate aus Kotproben gesunder Ferkel	$\bar{x}^{1)}$	$\bar{s}$	Isolate aus Kotproben kranker Ferkel	$\bar{x}^{1)}$	$\bar{s}$
P 8379/01	0,072	0,0021	P 2046/00	0,648	0,0120
P 8044/01	0,074	0,0035	IDT 142/00	0,460	0,0106
P 7964/01	0,140	0,0021	3866/04	0,537	0,0643
P 6901/01	0,103	0,0049	3878/04	0,506	0,0615
1) Optische Dichte					
$\Sigma$	$\bar{x}$ 0,097	$\bar{s}$ 0,0032		$\bar{x}$ 0,538	$\bar{s}$ 0,0371

**Tab. 20: Beta2-Toxin-Gehalt in Kulturüberständen aus Kotproben von *C. perfringens*-Isolaten von gesunden und kranken Ferkeln mit dem mAk 2-4C11 (Tag 2)**

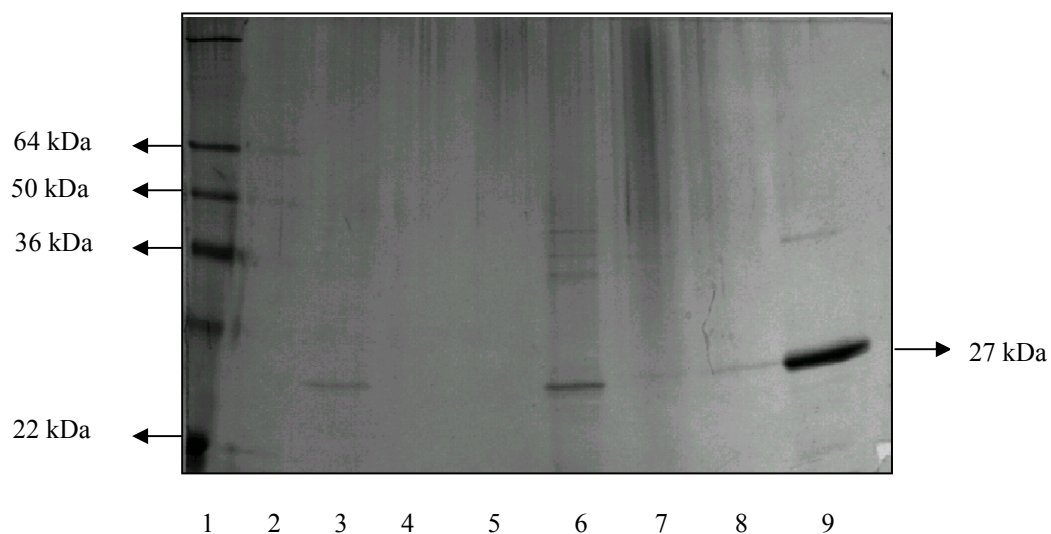
Isolate aus Kotproben gesunder Ferkel	$\bar{x}^{1)}$	$\bar{s}$	Isolate aus Kotproben kranker Ferkel	$\bar{x}^{1)}$	$\bar{s}$
P 8379/01	0,073	0,0014	P 2046/00	0,464	0,0162
P 8044/01	0,074	0,0035	IDT 142/00	0,357	0,0304
P 7964/01	0,107	0,0084	3866/04	0,364	0,0141
P 6901/01	0,094	0,0007	3878/04	0,376	0,0021
1) Optische Dichte					
$\Sigma$	$\bar{x}$ 0,087	$\bar{s}$ 0,0035		$\bar{x}$ 0,390	$\bar{s}$ 0,0157



## **4.7 Gewinnung von nativem Beta2-Toxin aus *C. perfringens*-Kulturüberständen**

### **4.7.1 Isolierung des nativen Beta2-Toxins mittels Anionenaustauschchromatographie**

Der geno- und phänotypische Beta2-Toxin-positive Kulturüberstand des *C. perfringens* Stammes IDT 18/00 wurde ammoniumsulfatgefällt und mittels der Anionenaustauschchromatographie das native Beta2-Toxin sensitiv aufgereinigt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine 0,25 M NaCl-Konzentration im Elutionspuffer zu einer spezifischen Aufreinigung von nativem Beta2-Toxin (0,5 µg/10 µl) (250 µg/ml) führt (Abb. 15; Spur 3). Nach Konzentration dieser Charge (Abb. 15; Spur 6) ließ sich die Menge an aufgereinigtem Beta2-Toxin um das Fünffache steigern (2,5 µg/10 µl). Die Aufreinigung mit Elutionspuffern mit einer 0,3 M und 0,4 M NaCl-Konzentration erwies sich als nicht ausreichend. In den Spuren 4 und 5 (Abb. 15) ist keine Bande für das Beta2-Toxin vorhanden. Nach Konzentrierung der 0,3 M und 0,4 M NaCl-Konzentration mittels Konzentratorsäulen (Abb. 15; Spur 7 und 8) stellen sich nur schwache Beta2-positive Reaktionen dar.

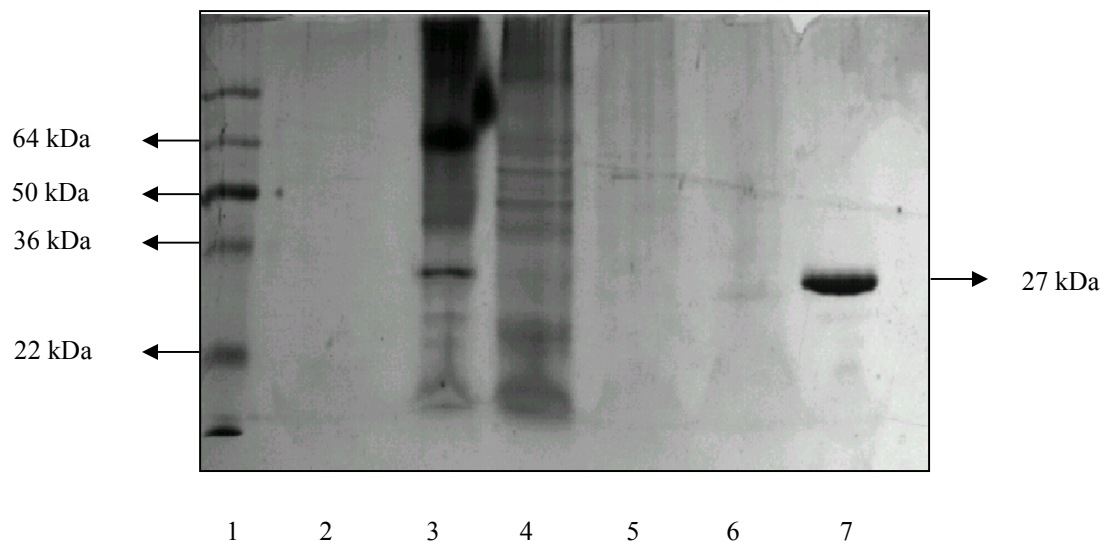


**Abb. 15: Nachweis des durch Anionenaustauschchromatographie extrahierten nativen Beta2-Toxins (SDS-Gelelektrophorese; Silberfärbung)**

- 1: Marker See Blue™ Plus2® (12 µl)
- 2: Durchfluß
- 3-5: Proben nach Elution mit 0,25 M (3); 0,3 M (4) und 0,4 M (5)  
NaCl Gradient **vor** Konzentratorsäule
- 6-8: Proben nach Elution mit 0,25 M (6); 0,3 M (7) und 0,4 M (8)  
NaCl Gradient **nach** Konzentratorsäule
- 9: Positivkontrolle: rBeta2-Toxin (5 µg/20 µl)

#### 4.7.2 Immunomagnetische Beta2-Toxinaufreinigung mittels Dynabeads

Aus dem Kulturüberstand des *C. perfringens*-Feldisolates (IDT 18/00) ließ sich das native Beta2-Toxin (Abb. 16 Spur 6) affinitätschromatographisch mittels an Dynabeads gekoppelte mAk (2-4A5 und 2-4C11) aufreinigen. Die Konzentration betrug 0,1 µg/20 µl (5 µg/ml). Die immunomagnetische Aufreinigung mittels Dynabeads erwies sich im Vergleich zur Anionenaustauschchromatographie als ungenügend. Bei der Anionenaustauschchromatographie betrug die Konzentration an nativem Beta2-Toxin 250 µg/ml, was eine Steigerung um das 50fache bedeutet.



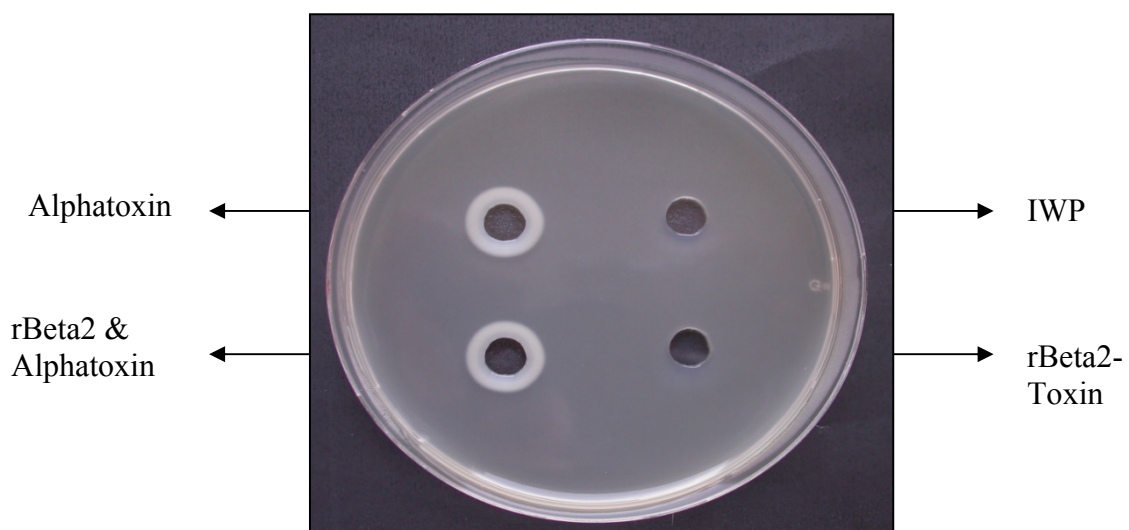
**Abb. 16:** Nachweis des nativen Beta2-Toxins aus *C. perfringens* Kulturüberstand mittels immunomagnetischer Protein-Isolation in der SDS-PAGE-Gelelektrophorese (Silberfärbung)

- |    |                                            |
|----|--------------------------------------------|
| 1: | Marker See Blue™ Plus2® (12 µl)            |
| 2: | Probenpuffer                               |
| 3: | Kulturüberstand des IDT 18/00              |
| 4: | 1. Separation mittels Dynabeads (25 µl)    |
| 5: | 2. Separation mittels Dynabeads (25 µl)    |
| 6: | 3. Separation mittels Dynabeads (25 µl)    |
| 7: | Positivkontrolle rBeta2-Toxin (5 µg/20 µl) |

## 4.8 Ergebnisse zur biologischen Aktivität des rekombinanten und nativen Beta2-Toxins von *C. perfringens*

### 4.8.1 Nachweis der enzymatischen Aktivität des rekombinanten Beta2-Toxins

Alpha-Toxin von *C. perfringens* ist als Metalloenzym in der Lage Phosphatidylcholin zu spalten, was in einem Eigelb-Agar zur Ausbildung eines Trübungshofes führt. Um die Frage zu klären, ob das Beta2-Toxin ebenfalls eine solche enzymatische Wirkung besitzt, wurden in Eigelbagar der Trübungshofdurchmesser des Beta2-Toxins allein und in Kombination mit dem Alpha-Toxin von *C. perfringens* bestimmt. Abb. 17 zeigt, dass das Beta2-Toxin allein keine enzymatische Wirkung aufweist. Auch eine Kombination von rBeta2-Toxin mit dem Alphatoxin führt zu keiner Vergrößerung des durch Alphatoxin allein bedingten Trübungshofdurchmessers.

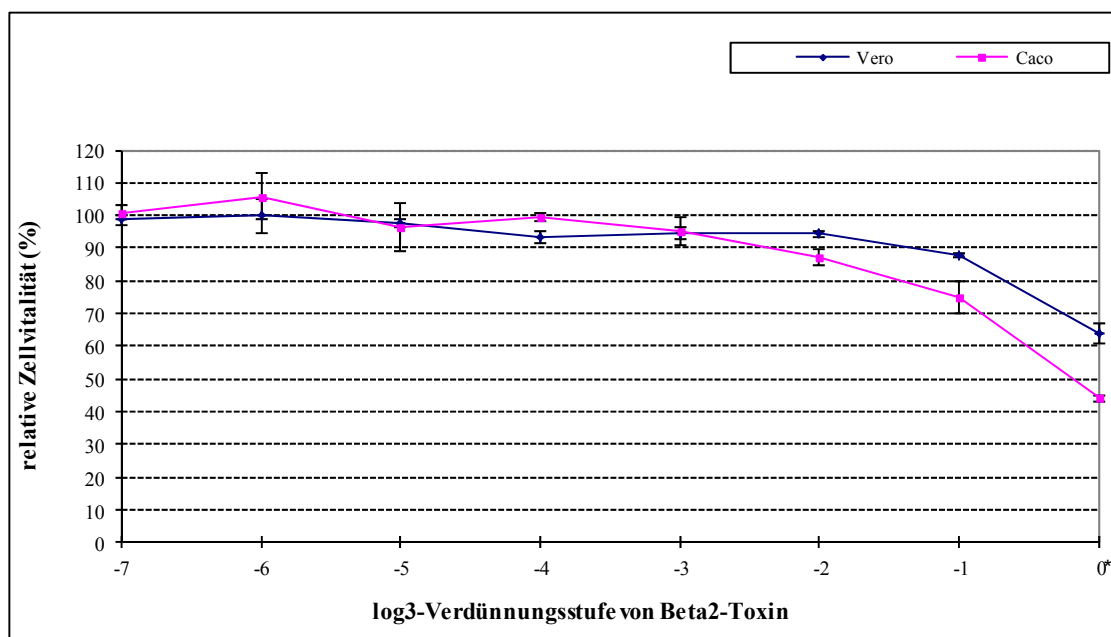


**Abb. 17:** *In vitro* Nachweis der enzymatischen Aktivität des rekombinanten Beta2-Toxins

IWP (Isotoner Waschpuffer)	(10 µl)
rBeta2- & Alphatoxin	(2,5 µg)
rBeta2-Toxin	(2,5 µg)
Alphatoxin	(2,5 µg)

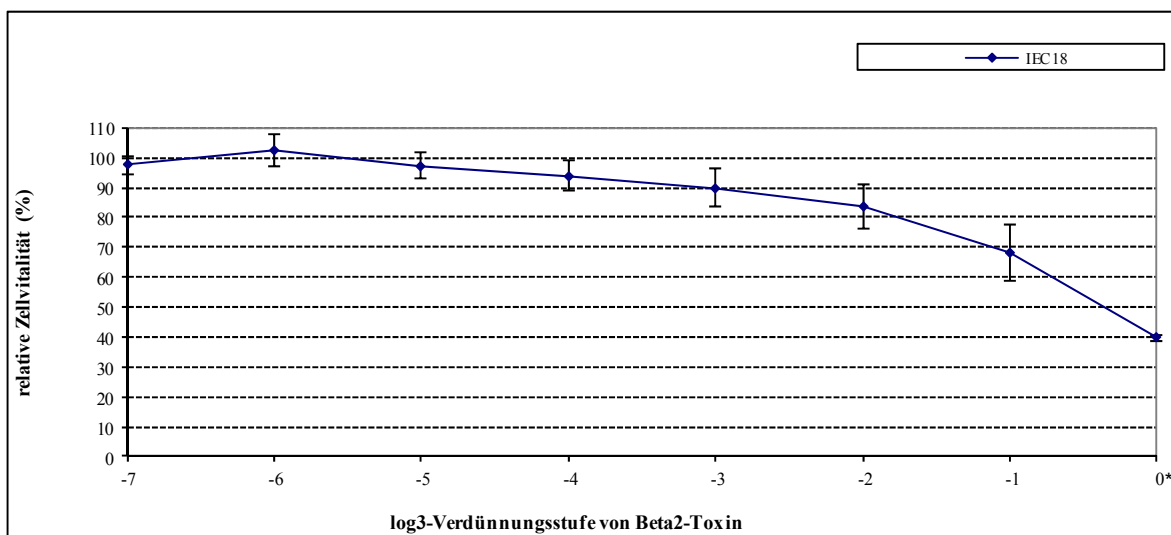
#### 4.8.2 Zytotoxische Aktivität des rekombinanten Beta2-Toxins für verschiedene Zelllinien

Das rBeta2-Toxin, mittels Induktion und Expression und anschließender Affinitätschromatographie gewonnen, wurde mit einer Anfangskonzentration von 10 µg/ml im Zytotoxizitätsassay getestet. Bei den Verozellen betrug die Stoffwechselaktivität mit der Anfangskonzentration des rBeta2-Toxins 65 %, bei den Cacozellen lag sie bei 45 %. Mit jeder weiteren Verdünnungsstufe ( $\log_3$ -Titration) nahm die relative Zellaktivität bis auf 100 % zu. Die Zellaktivität der IEC18-Zellen lag mit der Anfangskonzentration des rBeta2-Toxins bei 40 %. Auch hier nahm die Stoffwechselaktivität mit jeder Verdünnungsstufe bis letztendlich 100 % zu. Bei den CHO-Zellen konnte kein Effekt nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 18, 19 und 20 veranschaulicht dargestellt.



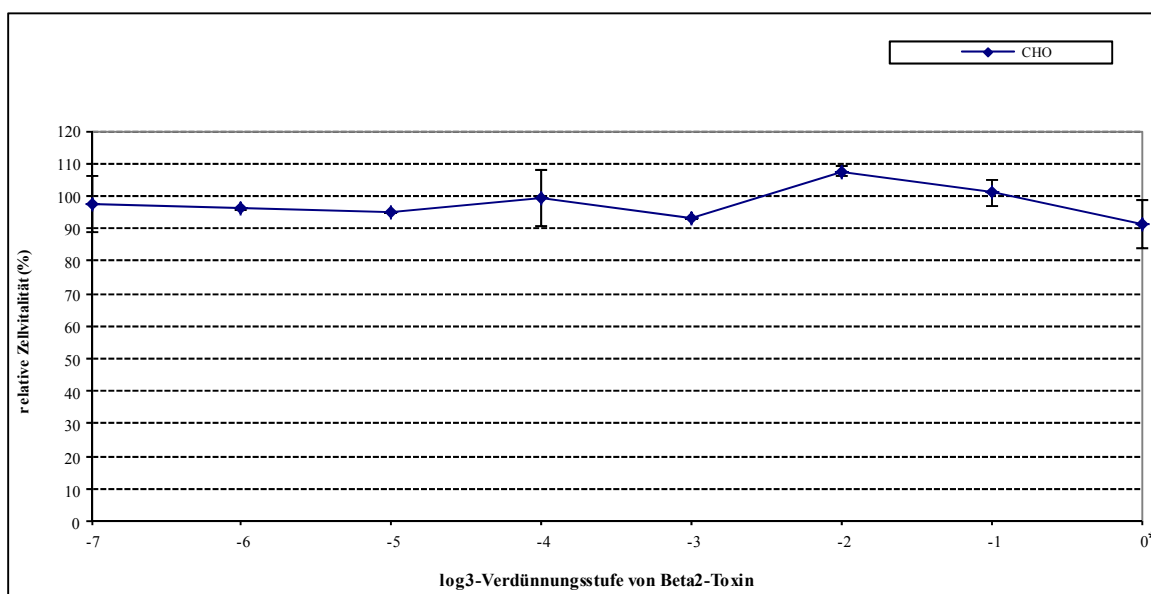
**Abb. 18: Zytotoxizitätsnachweis des rekombinanten Beta2-Toxins in Vero- und Cacozell-Kulturen**

\* 0 = unverdünntes rBeta2-Toxin (0,5 µg/100 µl)



**Abb. 19: Zytotoxizitätsnachweis des rekombinanten Beta2-Toxins in IEC18-Zell-Kulturen**

\* 0 = unverdünntes rBeta2-Toxin (0,5 µg/100 µl)



**Abb. 20: Zytotoxizitätsnachweis des rekombinanten Beta2-Toxins in CHO-Zell-Kulturen**

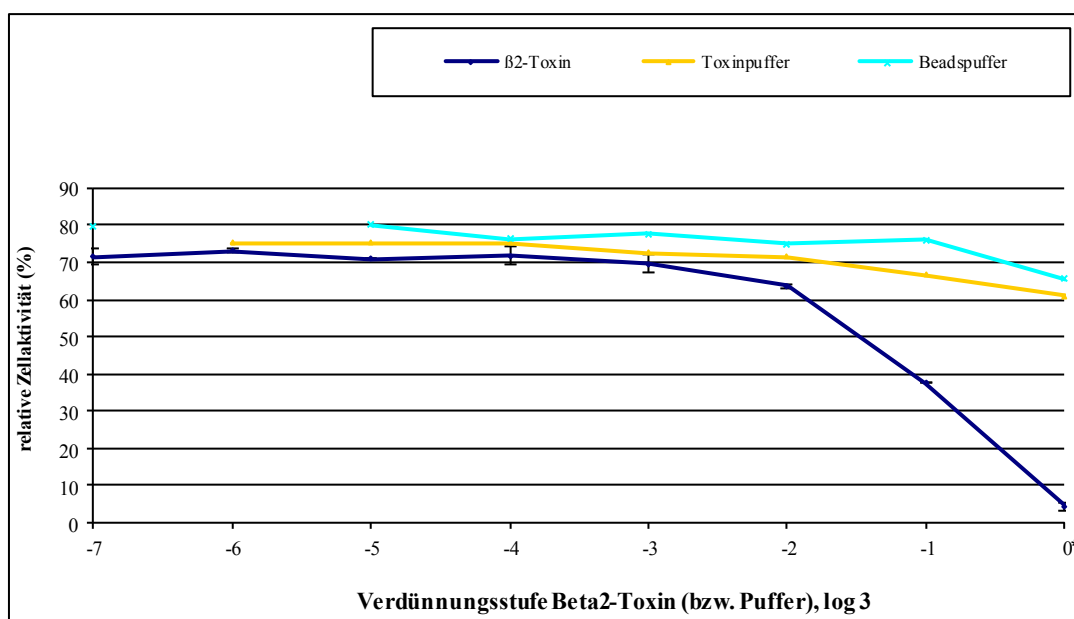
\* 0 = unverdünntes rBeta2-Toxin (0,5 µg/100 µl)

#### 4.8.3 Zytotoxische Aktivität des nativen Beta2-Toxins in verschiedenen Zelllinien

Zum Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurde das native Beta2-Toxin, mittels Anionenaustauschchromatographie bzw. immunomagnetischer Protein-Isolation aus *C. perfringens*-Kulturüberständen gewonnen, an verschiedenen Zelllinien untersucht.

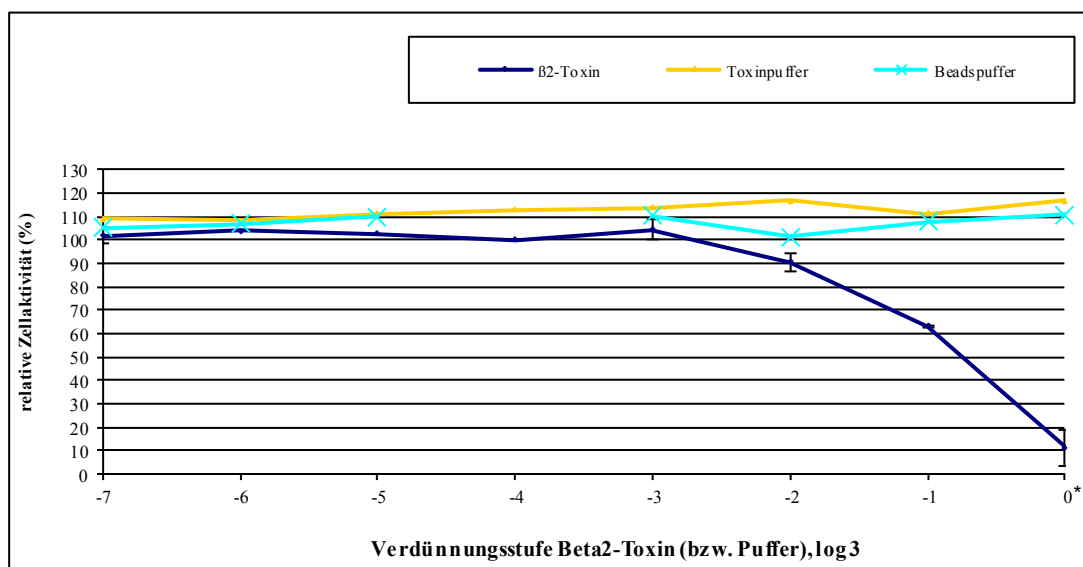
An den IEC18- und Verozellen verursachte das mittels immunomagnetischer Protein-Isolation aufgereinigte native Beta2-Toxin ab einer Konzentration von 12 µg/ml einen zytotoxischen Effekt. Bei den IEC18-Zellen betrug die Stoffwechselaktivität mit der Anfangskonzentration des nativen Beta2-Toxins von 12 µg/ml 5 % (Abb. 21) und bei den Verozellen lag sie bei 11 % (Abb. 22). Die relative Zellaktivität nahm mit jeder weiteren Verdünnungsstufe ( $\log_3$ -Titration) bei den IEC18-Zellen bis auf 70 % und bei den Verozellen bis 100 % zu. Beim Zytotoxizitätsnachweis des nativen Beta2-Toxins aus der Anionenaustauschchromatographie an IEC18- und 3T3n-Zellen betrug die Zellaktivität bei einer Anfangskonzentration von jeweils 12 µg/ml 5 % bei den IEC-Zellen und 10 % bei den 3T3n-Zellen. Mit weiteren Verdünnungsstufen nahm die Stoffwechselaktivität der IEC18-Zellen bis auf 75 % und bei den 3T3n-Zellen bis auf 90 % zu (Abb. 23). Die verwendeten Puffersubstanzen zeigten keine zelltoxische Wirkung.

Der zytotoxische Effekt des nativen Beta2-Toxin ist damit mindestens um das Achtfache höher als der des rekombinanten Beta2-Toxins.



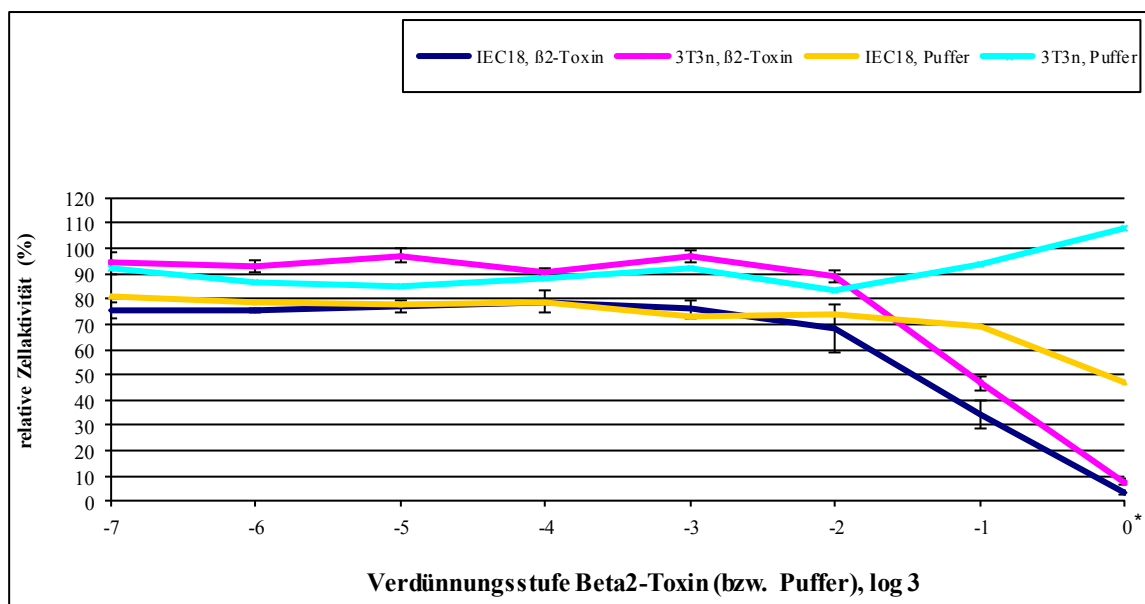
**Abb. 21:** Zytotoxizitätsnachweis des nativen Beta2-Toxins in IEC18-Zell-Kulturen

\* 0 = unverdünntes rBeta2-Toxin (0,6 µg/100 µl)



**Abb. 22: Zytotoxizitätsnachweis des nativen Beta2-Toxins in Verozell-Kulturen**

\* 0 = unverdünntes rBeta2-Toxin (0,6 µg/100 µl)



**Abb. 23: Zytotoxizitätsnachweis des nativen Beta2-Toxins in IEC18- und 3T3n-Zell Kulturen**

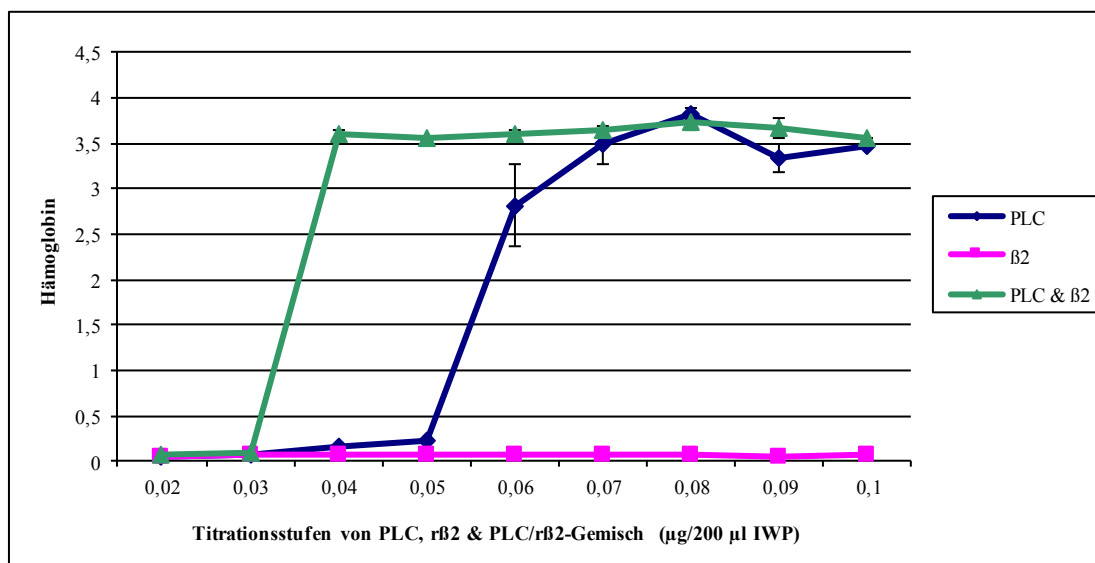
\* 0 = unverdünntes rBeta2-Toxin (0,6 µg/100 µl)



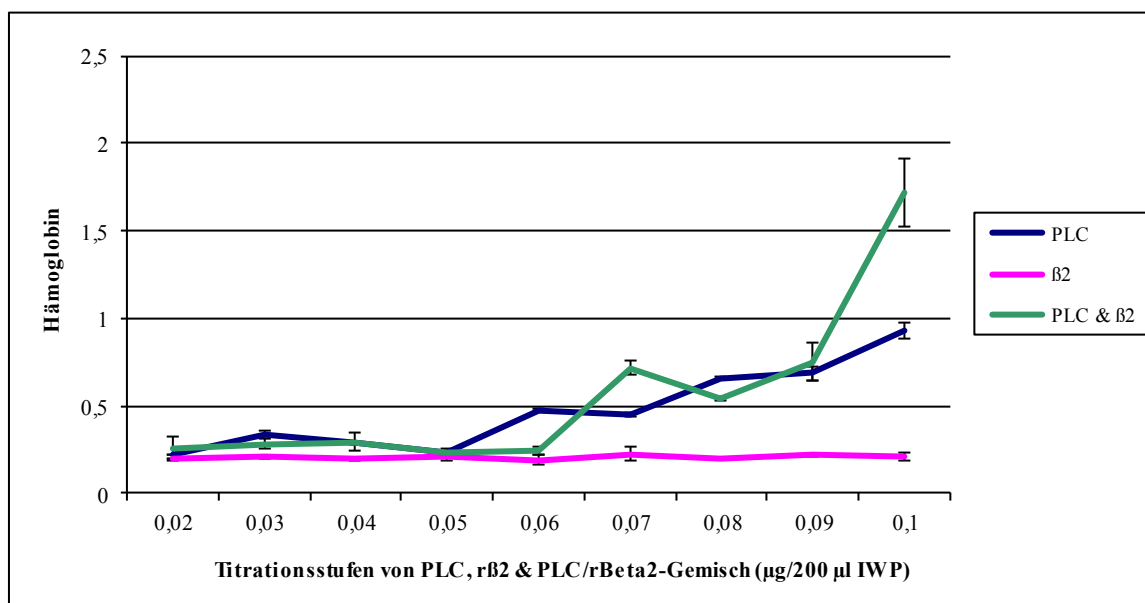
#### **4.8.4 Nachweis der hämolytischen Aktivität des Alphatoxins von *C. perfringens* nach Zugabe von rBeta2-Toxin**

Um zu überprüfen, ob die Alphatoxin (Plc)-induzierte Hämolyse durch die Zugabe des rBeta2-Toxins beeinflusst werden kann, wurden Kaninchen- und Ferkelerythrozyten mit definierten Konzentrationen des Alphatoxins und rBeta2-Toxins inkubiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer Konzentration von 0,04 µg Alphatoxin/200 µl IWP durch die Zugabe von rBeta2-Toxin die Alphatoxin-induzierte Hämolyse an Kaninchenerythrozyten um das 42-fache zum Ausgangswert (0,04 µg Alphatoxin alleine) gesteigert werden konnte (Abb. 24). Bei Ferkelerythrozyten gelang eine 7-fache Steigerung der Alphatoxin-induzierten Hämolyse bei einer Konzentration von 0,1 µg/200 µg IWP durch das rBeta2-Toxin (Abb. 25). Nach der Inkubation von Kaninchen- und Ferkelerythrozyten mit rBeta2-Toxin ließ sich in keiner Verdünnungsstufe ein hämolytischer Effekt nachweisen. Dies gibt Hinweis darauf, dass das rBeta2-Toxin in der Lage sein muss, die Alphatoxin-spezifische hämolytische Wirkung zu steigern.



**Abb. 24:** Nachweis der hämolytischen Wirkung von PLC, rBeta2-Toxin und PLC/rBeta2-Gemisch an Kaninchenerythrozyten

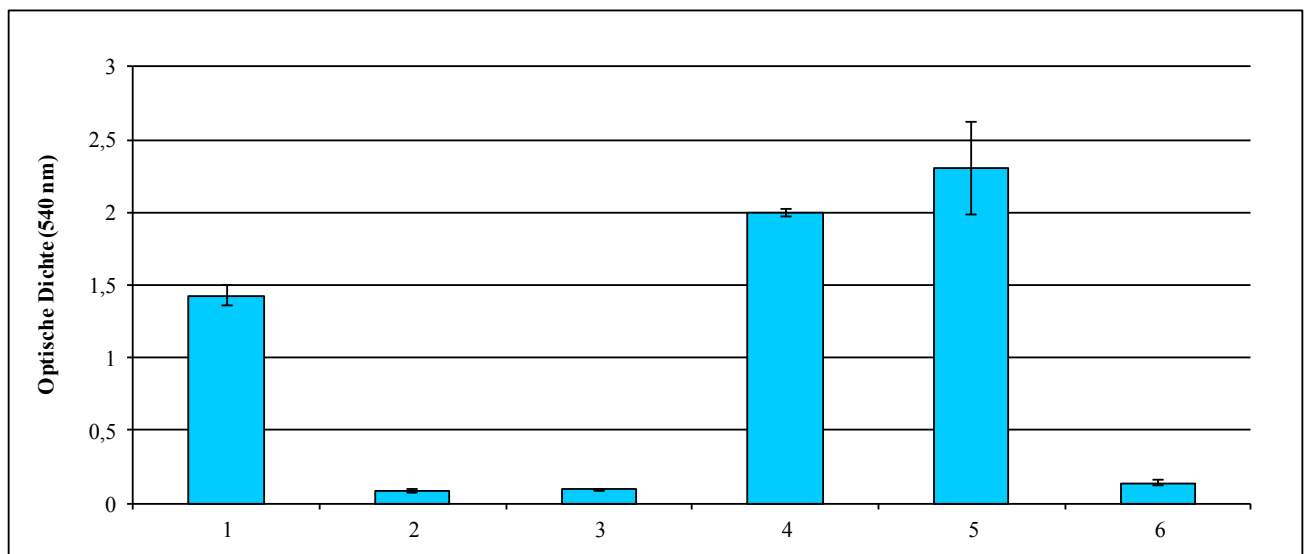


**Abb. 25:** Nachweis der hämolytischen Wirkung von PLC, rBeta2-Toxin und PLC/rBeta2-Gemisch an Ferkelerthrozyten

#### 4.8.5 Nachweis der hämolytischen Wirkung von Alphatoxin- und Beta2-Toxin-positivem *C. perfringens* Kulturüberstand nach Präinkubation mit dem mAk 2-4C11

Um zu prüfen, ob die Alphatoxin-induzierten Hämolyse eines Alpha- und Beta2-Toxin positiven *C. perfringens*-Kulturüberstandes (IDT 18/00) nach Zugabe des Beta2-spezifischen monoklonalen Antikörpers 2-4C11 reduziert werden kann, wurde der *C. perfringens* Kulturüberstand mit dem mAk 2-4C11 präinkubiert und nachfolgend auf seine hämolytische Wirkung geprüft.

Die Ergebnisse zeigen, dass nach Zugabe des mAk 2-4C11 die hämolytische Wirkung des Alpha- und Beta2-Toxin positiven *C. perfringens*-Kulturüberstandes signifikant reduziert werden konnte (Säule 2). Die Präinkubation des Alphatoxins mit dem Beta2-spezifischen mAk 2-4C11 ließ die hämolytische Wirkung des Alphatoxins unbeeinflusst (Säule 4).



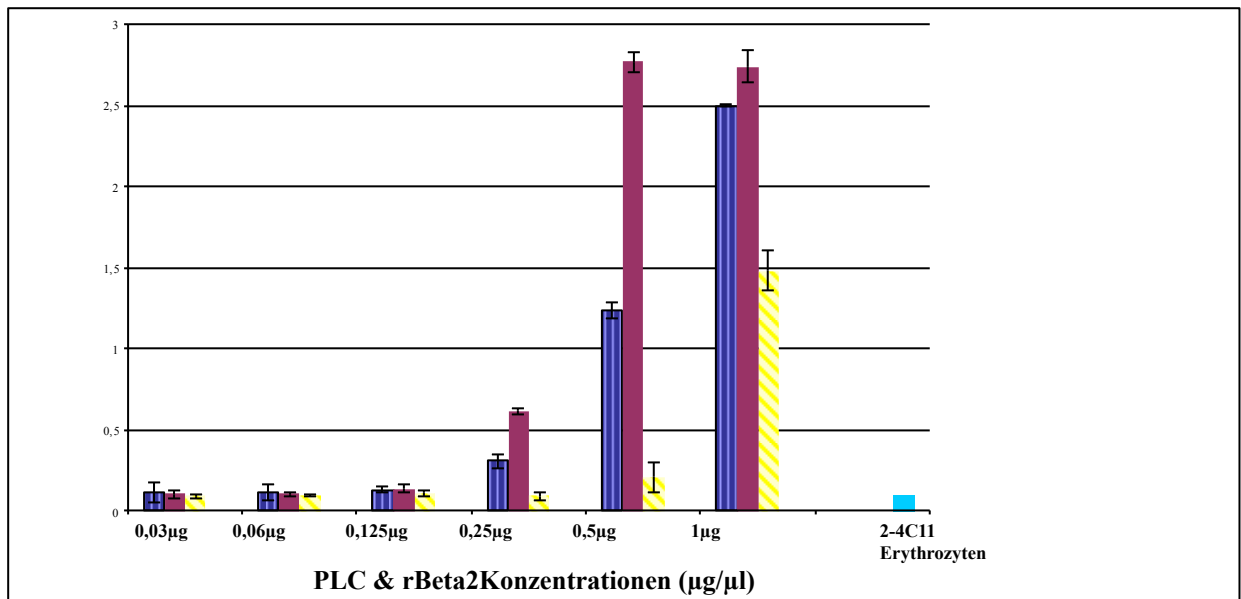
**Abb. 26:** Nachweis der antihämolytischen Wirkung des mAk 2-4C11 nach Präinkubation mit dem Beta2-Toxin *C. perfringens*-Kulturüberstand IDT 18/00

1.:	IDT 18/00	4.:	Alphatoxin & mAk 2-4C11
2.:	IDT 18/00 & mAk 2-4C11	5.:	Systemkontrolle (A. bidest)
3.:	mAk 2-4C11	6.:	Negativkontrolle (IWP)

#### **4.8.6 Nachweis der hämolytischen Wirkung des Alphatoxin- und rBeta2-Toxins nach Präinkubation mit dem mAk 2-4C11**

Nachdem festgestellt werden konnte, dass das rBeta2-Toxin nach Zugabe zu Alphatoxin in der Lage war, die Alphatoxin-induzierte Hämolyse zu steigern und dieser Effekt nach Präinkubation mit dem mAk 2-4C11 aufgehoben werden konnte, sollte festgestellt werden, ob dieser Effekt dosisabhängig nachgemessen werden konnte.

Die Ergebnisse in Abb. 27 zeigen, dass es zu einer dosisabhängigen Steigerung der Alphatoxin-induzierten Hämolyse nach Zugabe des rBeta2-Toxins kam. Dieser Effekt ließ sich deutlich nach Zugabe des Beta2-spezifischen mAk 2-4C11 reduzieren.



**Abb. 27:** Nachweis der dosisabhängigen hämolytischen Wirkung von Alphatoxin (PLC) nach Zugabe des rBeta2-Toxins ohne und mit Präinkubation durch den Beta2-spezifischen mAk 2-4C11

■ PLC

■ PLC & rBeta2

■ PLC & rBeta2 & mAk 2-4C11

■ mAk 2-4C11 & Erythrozyten

## 5 DISKUSSION

Genotypische Diagnoseverfahren, wie die PCR, zum Nachweis Beta2-Toxin-bildender *C. perfringens*-Stämme sind für eine Aussage über eine Beteiligung des Beta2-Toxins an der Pathogenese der nekrotisierenden Enteritis unzureichend, da ihnen nicht zu entnehmen ist, ob und wieviel Beta2-Toxin von den *C. perfringens*-Stämmen tatsächlich exprimiert wird.

Ziel dieser Arbeit war es daher, mittels eigens hergestellter Beta2-spezifischer monoklonaler Antikörper ein ELISA-System zu entwickeln, welches den phänotypischen Nachweis des *C. perfringens*-Beta2-Toxins erlaubt, sowie seine Erprobung an *C. perfringens*-Isolaten aus Schweinekotproben.

Die unter Verwendung des rekombinanten Beta2-Toxoids festgestellte Immunreaktivität der gewonnenen Antiseren gegenüber dem *C. perfringens*-Wildtypotoxin erlaubten die Annahme, dass es möglich sein musste, Beta2-wildtypspezifische monoklonale Antikörper zu generieren.

Mit der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das Beta2-Toxin von *C. perfringens* sollte ein empfindliches *in-vitro*-Nachweissystem für die Detektion von Beta2-Toxin in *C. perfringens*-Kulturüberständen etabliert werden. Ein auf dieser Basis evaluierter Beta2-spezifischer Fangantikörper-ELISA sollte eine vergleichende quantitative Analyse von Beta2-Toxin in *C. perfringens*-Kulturüberständen von Feldisolaten aus Kotproben gesunder und kranker Saugferkel erlauben.

Die in dieser Arbeit von den Zell-Linien 2-4A5 und 2-4C11 produzierten Antikörper fielen durch hohe Absorption, 0,3µg/100µl der mAk 2-4A5 und 0,4µg/100µl der mAk 2-4C11, gegenüber dem rekombinanten Beta2-Toxoid im ELISA auf. Beide monoklonalen Antikörper (2-4A5 und 2-4C11) erwiesen sich aufgrund ihrer hohen Affinität gegenüber dem Beta2-Toxin als geeignete Fänger für das Wildtypotoxin im ELISA. Sie erkannten zudem unterschiedliche Epitope auf dem rBeta2-Toxin.

Da der Beta2-spezifische Fangantikörper-ELISA zur Detektion von Wildtypotoxin in *C. perfringens*-Kulturüberständen auch nahe der Nachweisgrenze und bei einem umfangreichen Proteingemisch noch präzise, reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse liefern sollte, wurden die Qualitätsparameter „Verdünnungsechtheit, Intra- und Inter-Assay-Präzision“ bestimmt.

Das Beta2-Toxin ließ sich mit dem in dieser Arbeit entwickelten Aufbau (siehe Abb. 13) bis zu einer Konzentration von 2,5 ng/ml (mAk 2-4A5) bzw. 10,0 ng/ml (mAk 2-4C11) nachweisen. Die Nachweisgrenze liegt somit im ähnlichen Bereich wie beim Antigen-Capture-ELISA der Arbeitsgruppe Kircanski (2012), der bereits Konzentrationen von 3,5 ng/ml detektierte.

Bei der Inter-Assay-Präzision lag der Variationskoeffizient <20%, d. h. es liegt eine hinreichende Genauigkeit vor. Die Intra-Assay-Präzision, d. h. die Schwankungen des ELISA-Systems innerhalb eines Ansatzes lagen ebenfalls <20%, was die gute Reproduzierbarkeit des Systems bestätigte.

Bei kommerziellen Testkits werden Werte bei der Intra-Assay-Präzision von 4,1 % und 8,4 %, erreicht und bei der Inter-Assay-Präzision von 10,9 % und 5,9 % (Biosource ELISA-KIT NF-KBp65 & AKT (pt308)). Prince et al. (1987) konnten bei der Etablierung eines ELISA Intra- und Inter-Assay-Präzisionen von 8 % und weniger festlegen. Die Messwerte des in dieser Arbeit entwickelten Capture-ELISA sind kleiner 20 % und erfüllen somit die Voraussetzung für ein leistungsfähiges Testverfahren.

Untersuchungen zur Sensitivität des Beta2-spezifischen Fangantikörper-ELISA haben gezeigt, dass alle 18 Beta2-genotypisch positiven *C. perfringens*-Feldisolate im Fangantikörper-ELISA mit beiden mAk (2-4A5 und 2-4C11) erkannt werden, dies entspricht einer Sensitivität von 100 %.

Ein wichtiges Kriterium für die Reproduzierbarkeit eines *in-vitro*-Testsystems ist die Spezifität, welche im Wesentlichen durch die Epitop-spezifischen Antigenerkennungen der Antikörper (2-4A5 und 2-4C11) bestimmt wird. Unter Verwendung von Kulturüberständen anderer Clostridienspezies, grampositiver und gramnegativer Keime gelang es, auch eine 100%ige Diagnostik-Spezifität des neu entwickelten ELISA-Systems zu belegen (siehe Kapitel 4.6.9)

Die mit dem neu entwickelten Beta2-spezifischen Fang-Antikörper-ELISA durchgeführte vergleichende Analyse der Kulturüberstände von *C. perfringens*-Feldisolaten aus Kotproben gesunder und kranker Saugferkel ergab signifikante Unterschiede in den gemessenen Expressionsleveln. So lagen die Beta2-Toxine-Werte in den Kulturüberständen von Isolaten

aus Kotproben Durchfall-kranker Saugferkel mit beiden monoklonalen Antikörpern (2-4A5 & 2-4C11) fünffach höher als die der gesunden Tiere.

Bereits in der von Waters et al. (2003) durchgeführten molekularbiologischen Untersuchung hatte sich gezeigt, dass in den Kotproben der an Durchfall erkrankten Schweine vermehrt Beta2-Toxigen-positive Isolate gefunden wurden, wohingegen bei keinem von 6 gesunden Tieren ein *cpb2*-positives *C. perfringens*-Isolat nachgewiesen werden konnte. Daraus hatten die Autoren auf eine Beteiligung von Beta2-Toxigen-positiven *C. perfringens*-Stämmen an Durchfallerkrankungen bei Schweinen geschlossen.

In 33 untersuchten *C. perfringens*-Stämmen aus Kotproben durchfallkranker und 7 *C. perfringens*-Stämmen gesunder Ferkel hatten zuvor Garmory et al. (2000) 82 % der erkrankten und keines der gesunden Tiere als Träger Beta2-positiver Typ A-Stämme ermittelt, was die Vermutung von Waters et al. (2003) unterstrich. In einer weiteren Studie von Bueschel et al. (2003) waren 90,9 % der isolierten *C. perfringens* Typ A-Stämme und 97,2 % *C. perfringens* Typ C-Stämme an Enteritis erkrankter Ferkel Beta2-Toxigen-positiv. Der erfolgreiche Einsatz Beta2-Toxigen-positiver *C. perfringens* Typ A-Vakzinen in Schweinebetrieben mit Durchfallerkrankungen (Selbitz et al. 2000) unterstützt die Vermutung, dass das *C. perfringens*-Beta2-Toxin an der Pathogenese von Durchfallerkrankungen beteiligt sein könnte. Auch beim Kalb wird eine Bedeutung des Beta2-Toxins für die Pathogenese von Jungtierdurchfällen diskutiert (Nikolaou et al. 2009). Lebrun et al. (2007b) wiesen an *C. perfringens*-Isolaten aus Kotproben an Enterotoxämie erkrankter Kälber das Beta2-Toxigen in 68 % (n = 41) der Isolate nach, in der gesunden Kontrollgruppe wurden demgegenüber nur 46 % (n = 87) der Isolate als Beta2-Toxigen-positiv identifiziert. Interessanterweise besaßen 100 % der *cpb2*-positiven Isolate der Enterotoxämiegruppe das Konsensus-Beta2-Toxigen, welches zudem von >64 % der Isolate exprimiert wurde (Lebrun, Filee et al., 2007b). Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass *C. perfringens* Subpopulationen mit starker Konsensus-Beta-2-Toxinbildung Auslöser der Erkrankung sein könnten (Lebrun et al., 2007b). Ein *cpb2*-positives Isolat vom Kalb löste zudem deutliche Läsionen im ileal loop-Modell aus, im Gegensatz zu 3 *cpb2*-negativen Stämmen (Manteca et al. 2002). Allerdings können Beta2-toxigene Stämme immer wieder auch bei gesunden Tieren, so z. Bsp. regelmäßig beim Geflügel, nachgewiesen werden (Esmay et al. 2003).

In der Pathogenese von *C. perfringens* verursachten Darmerkrankungen soll das Alpahtoxin, generell als alleiniger Virulenzfaktor von Typ A-Stämmen angesehen, bisher nur eine



untergeordnete Rolle im Krankheitsgeschehen spielen (Hatheway 1990; Johannsen et al., 1993).

Lediglich Songer et al. (1996) spekulierten, dass die Enteropathogenität von *C. perfringens*-Stämmen von der Bildung hoher Mengen an Alphatoxin abhängt. Unter Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten Beta2-spezifischen Capture-ELISA wurden daher 48 *C. perfringens* Feldisolate, die aus Kotproben gesunder und durchfallkranker Ferkel gewonnen worden waren, untersucht. Innerhalb des gesamten Probenmaterials wurde der Typ A am häufigsten nachgewiesen, dabei lag der Anteil der Typ A-Stämme bei 91,7 % und der Typ C-Stämme bei 8,3 %. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen daher eine Beteiligung von Beta2 exprimierender *C. perfringens* Typ A-Stämme bei Durchfallerkrankungen der Saugferkel vermuten.

Die in dieser Arbeit dargestellte Bedeutung von *C. perfringens*-Alpha- und Beta2-toxinbildenden Typ A-Stämmen im Durchfallgeschehen von Saugferkeln wurde zuletzt auch durch die Ergebnisse von Springer et al. (2012) bestätigt. In dieser Studie sind mehr als 1.400 Saugferkel, die an Durchfall erkrankt waren, untersucht worden. Dabei entfielen >80% der isolierten Stämme auf Beta2-bildende Typ A-Stämme und nur knapp 6% auf Beta2- bildende Typ C-Stämme. Darüber hinaus ließen sich nach Immunisierung mit Alpha-und Beta2-toxoidhaltiger *C. perfringens* Typ A-Vakzine für Schweine im Intoxikationsmodell eine Schutzwirkung erzielen (Springer et al., 2012).

In dieser Arbeit ließ sich eine zytotoxische Wirkung des nativen Beta2-Toxins bei einer Konzentration von 12 µg/ml auf IEC18-Zellen, 3T3n-Zellen und Verozellen nachweisen. Jolivet-Reynaud et al. (1986) und Gibert et al. (1997) konnten mit Konzentrationen von 0,1 – 10 µg/ml bzw. 20µg/ml an CHO-Zellen und der Intestinal-Zelllinie I407 zytotoxische Aktivitäten nachweisen, wobei der Wirkmechanismus, der diese zytotoxischen Effekte auslöst, noch weitgehend ungeklärt ist. Gujar et al. bewerten die hohen Beta2-Konzentrationen (>10µg/ml), die notwendig sind, um diese zytotoxischen Effekte hervorzurufen, als Hinweis darauf, dass es sich um ein akzessorisches Toxin handelt, welches einen synergistischen Effekt mit anderen *C. perfringens*-Toxinen insbesondere des Alphatoxins, entfaltet (Gurjar et al., 2008).

Das rekombinante Beta2-Toxin zeigte mit einer Anfangskonzentration von 10 µg/ml bei Verozellen, CaCo-Zellen und IEC18-Zellen eine zytotoxische Aktivität. An CHO-Zellen konnte mit der Zugabe des rekombinanten Beta2-Toxins kein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden.

Die Zellaktivität von IEC18-Zellen war unter rBeta2-Toxin in der Anfangskonzentration auf 40% und unter nativem Beta2-Toxin auf 5% herabgesetzt, woraus sich für Letzteres eine achtfach höhere Zytotoxizität ergibt. Bei Verozellen lag die Zellaktivität unter rBeta2-Toxin bei 65% und unter nativem Beta2-Toxin bei 11%. Diese sechsfach höhere Zytotoxizität lässt sich möglicherweise durch eine Konformationswanderung durch das Affinitätsanhängsel erklären, was in der Literatur als Grund für einen Aktivitätsverlust beschrieben ist (Heydel, 2010). Roskens et al. (2008) konnten ebenfalls mit verschiedenen Varianten des rekombinanten Beta2-Toxins aus *E. coli* eine zytotoxische Wirkung an Zelllinien nachweisen.

In späteren Untersuchungen (Heydel, 2010) konnten keine zytotoxische Aktivitäten des rBeta2-Toxins in Zellkulturversuchen beobachtet werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten zytologischen Effekte des rBeta2-Toxins sind somit möglicherweise einem co-eluierten toxischen Produkt des Expressionstammes zuzuordnen, das sich im rBeta2-Toxin befand.

Wenn auch das rBeta2-Toxin im Eigelb-Agar-Diffusions-Trübungstest keine biologische Aktivität zeigte (siehe Abb. 16 Ergebnisteil), konnte nach Zugabe von rBeta2-Toxin die Alphatoxin-induzierte Hämolyse an Ferkelerythrozyten um das 7fache, und an Kaninchenerythrozyten um das 42fache gesteigert werden. Dieser Effekt ließ sich durch Zugabe der Beta2-spezifischen mAk (2-4A5 und 2-4C11) nahezu aufheben.

Diese Ergebnisse geben Hinweise auf eine synergistische Wirkung zwischen dem Alphatoxin- und dem Beta2-Toxin. Einen solchen synergistischen Effekt beider Toxine diskutieren auch Springer et al. (2012) und Gurjar et al. (2008).

Die Untersuchungen einiger Arbeiten geben Hinweise darauf, dass das Beta2-Toxigen aus Isolaten durchfallkranker Tiere einer Heraufregulation unterliegt.

Der *C. perfringens*-Referenzstamm 13 kodiert das Beta2-Gen (*cpb2*) auf einem 54,3 kb großen Plasmid, „pCP13“ (Gibert et al. 1997; Shimizu et al. 2002). Zudem trägt das „pCP13“ auch ein weiteres Virulenzgen, ein Kollagen-Adhäsion, „*cna*“, (Shimizu et al. 2002). Die Fähigkeit, Kollagen zu binden, ist bei anderen grampositiven Bakterien ein Virulenzfaktor,

wie zum Beispiel bei *Staphylococcus aureus* (Xu et al., 2004), *Enterococcus faecalis* (Hubble et al., 2003) und *Arcanobacterium pyogenes* (Esmay et al., 2003).

In einer von Jost et al. (2006) durchgeführten Studie wurde das „cna“-Gen bei 68,1 % der *C. perfringens*-Schweinsisolate (n = 119) gefunden. In allen Beta2-Gen-positiven Isolaten war das „cna“-Gen bei 69,9 % (n = 153) vorhanden, davon waren 98,7 % (n = 75) Schweineisolate. Sowohl das *cpb2*, als auch das „cna“ werden über das Zweikomponenten VirR/VirS Regulationssystem transkriptional gesteuert, wie auch andere Toxine (z. B. das Alphatoxin) von *C. perfringens*. Dieses System ist mit Hilfe eines externen Stimulus in der Lage, die Transkription der Zielgene zu beeinflussen (Ba-Thein et al. 1996). Das *cpb2* wird mittels dieses Systems heraufreguliert, während das „cna“ herunterreguliert wird (Ohtani et al. 2003). Dieses Zusammenspiel läßt vermuten, dass das „cna“ im frühen Stadium der Infektion für die Adhäsion verantwortlich ist, wohingegen das *cpb2* exprimiert wird, um am Zielgewebe Läsionen hervorzurufen. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass beide Gene wirtsspezifische Virulenzfaktoren darstellen (Jost et al. 2006).

Eine genauere Quantifizierung des Beta2-Toxins und damit die Bestimmung des Beta2-Gehalts in *C. perfringens*-Kulturüberständen ist mit dem in dieser Arbeit entwickelten Beta2-Toxin-Capture-ELISA möglich. Durch seine Sensitivität und Spezifität von 100% kann von einer gesicherten Aussage, ob Beta2-Toxin exprimiert wird, ausgegangen werden. Diese Tatsache in Zusammenhang mit der Fähigkeit, das Expressionslevel des Beta2-Toxins mittels des Fangantikörper-ELISAs quantitativ zu bestimmen, erlauben eine Anwendung dieses Testsystems unter Routinebedingungen.

## 6 Zusammenfassung

Beta2-Toxigen-positive *C. perfringens* Typ A- und C-Stämme werden häufig bei Durchfallerkrankungen von Saugferkeln isoliert. Die Bedeutung des Beta2-Toxins in der Pathogenese ist bisher nicht eindeutig geklärt. Der Nachweis Beta2-Toxigen-positiver Stämme, die mittels PCR identifiziert werden, läßt keinerlei Aussage darüber zu, ob und wie viel Beta2-Toxin während der Vermehrung in den Kulturüberstand exprimiert wird. Es wurde daher versucht, eine quantitative Methode zu entwickeln, die eine Bestimmung des Beta2-Toxingehalts in *C. perfringens*-Kulturüberständen erlaubt.

Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit ein Fangantikörper-ELISA zum Nachweis von Beta2-Toxin aus *C. perfringens*-Kulturüberständen entwickelt. Der Test wurde auf seine Eignung für den quantitativen Nachweis von Beta2-Toxin in *C. perfringens*-Kulturüberständen, die von Isolaten aus Kotproben gesunder und durchfallerkrankter Ferkel gewonnen wurden, geprüft.

Mittels pASK-IBA2 Vektor gelang die gezielte Expression eines rekombinanten Beta2-Toxins aus *E. coli*. Unter Verwendung des affinitätschromatographisch aufgereinigten rBeta2-Toxins konnten nach Immunisierung, Wildtypotoxin-erkennende polyklonale (pAk) und zwei monoklonale Antikörper (2-4A5 und 2-4C11) gewonnen werden.

Unter Verwendung von *C. perfringens*-Kulturüberständen sowie Kulturüberständen weiterer grampositiver und gramnegativer Keime wurde der entwickelte Fangantikörper-ELISA auf Reproduzierbarkeit, Verdünnungsechtheit, Sensitivität und Spezifität getestet.

Mittels Inter-Assay-Präzision wurde die Reproduzierbarkeit bzw. der Grad der Schwankungen des ELISA zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei wiederholter Testung gemessen, wobei der Variationskoeffizient <20% betrug, was einer hinreichenden Genauigkeit entspricht.

Mittels Intra-Assay-Präzision wurden die Schwankungen innerhalb eines Ansatzes überprüft und die gute Reproduzierbarkeit des Systems, mit einem Variationskoeffizienten <20%, bestätigt.

Die Sensitivität des Beta2-spezifischen Fangantikörper-ELISAs lag nach Untersuchungen mit 18 genotypisch Beta2-positiven *C. perfringens*-Feldisolaten bei 100 %.

Kulturüberstände anderer Clostridienspezies sowie grampositiver und gramnegativer Keime zeigten keinerlei Kreuzreaktion mit den im Fangantikörper-ELISA verwendeten Nachweisantikörpern. Daraus ergab sich eine Diagnostik-Spezifität von 100%.

48 *C. perfringens*-Feldisolate, die von Kotproben gesunder und kranker Ferkel stammten, wurden mittels des Beta2-spezifischen Fangantikörper-ELISAs untersucht. Der gemessene Beta2-Toxin Gehalt in den Kulturüberständen von Isolaten aus Kotproben erkrankter Tiere, zeigte bei beiden mAk (2-4A5 und 2-4C11) fünffach höhere Werte als die bei den Isolaten gesunder Saugferkel. Im genotypischen Nachweis handelte es sich um 88 % Typ A-Stämme und 12 % Typ C-Stämme.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob bei nativem und rekombinantem Beta2-Toxin eine zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden kann. An verschiedenen Zelllinien ließ sich sowohl für das native als auch das rekombinante Toxin eine Zytotoxizität nachweisen, wobei das native Beta2-Toxin eine bis zu achtfach höhere Zytotoxizität gegenüber dem rekombinant hergestellten Beta2-Toxin aufwies. In weiteren Versuchen an Kaninchen- und Ferkelerythrozyten zur Hämolyse-Wirkung von Alphatoxin war festzustellen, dass die Alphatoxin-induzierte Hämolyse durch Zugabe von rBeta2-Toxin signifikant gesteigert werden konnte, was deutliche Hinweise auf einen Synergismus beider Toxine gibt. Dies wird bestätigt durch die Tatsache, dass sich dieser Effekt durch Zugabe des Beta2-spezifischen mAk 2-4C11 zum Präinkubationsgemisch (rBeta2 und PLC) aufheben ließ.

Der hier entwickelte Fangantikörper-ELISA stellt eine geeignete Methode zum quantitativen Nachweis von Beta2-Toxin in *C. perfringens*-Kulturüberständen unter Routinebedingungen dar.

## 7 SUMMARY

*C. perfringens* Type A and C strains which produce Beta2-toxins, are often isolated during diarrhoea. The exact meaning of these Beta2-toxins are yet unknown. No assumption can be made, by PCR determined Beta2-toxin positive *C. perfringens* species, if and how much Beta2-toxin is expressed in the culture supernatant. Hence, the aim of this study was to establish a quantitative method, a Capture-ELISA, which determines the Beta2-toxin concentration in culture supernatant of *C. perfringens*. Its suitability was tested with *C. perfringens* isolates derived from faecal samples of healthy and diarrhoea sick piglets.

A focused expression of the recombinant Beta2-toxin from *E. coli* was achieved, using a pASK-IBA2 vector. The use of purified recombinant Beta2-toxin, through affinity chromatography, enabled the gain of wildtype toxin recognising polyclonal (pAB) and monoclonal antibodies (mAB, 2-4A5 and 2-4C11), after immunisation.

Culture supernatant of *C. perfringens*, and also the culture supernatant of other Gram positive and Gram negative bacteria were used to test and determine the reproducibility, dilution authenticity, sensitivity and specificity of the established Capture-ELISA.

Inter/Intra-Assay-Precision Tests examined the reproducibility and respectively, the fluctuation of the Capture-ELISA at different time intervals, as well as within each trial attempt. In both cases, a coefficient of variation < 20% resulted, indicating a sufficient accuracy.

The sensitivity of the Beta2-specific Capture-ELISA was 100%, after the analyses of 18 genotypical Beta2-positive *C. perfringens* field isolates.

Culture supernatants of other Clostridia species, Gram negative and Gram positive bacteria showed no cross reaction with the Capture-ELISA used antibodies. Therefore, a diagnostic specificity of 100% is given.

48 *C. perfringens* field isolates, which were obtained from faecal samples of healthy and sick piglets, were analysed with the Beta2-specific Capture-ELISA. Faecal samples of the sick piglets showed fivefold higher concentrations of Beta2-toxin for both mABs (2-4A5 and 2-4C11) compared to fecal samples of the healthy piglets. *C. perfringens* Type A strains represented 88% and *C. perfringens* Type C strains represented 12% within the faecal samples.

Possible cytotoxic effects of native and recombinant Beta2-toxin were also examined. Both native and recombinant Beta2-toxin showed cytotoxic effects in different cell lines, although

the cytotoxic effect of native Beta2-toxin was eightfold higher than that of the recombined Beta2-toxin. The addition of the recombined Beta2-toxin provoked a significant increase of  $\alpha$  toxin- induced haemolysis, indicating a synergistic effect for both toxins. This effect is abolishable when adding Beta2-specific mAB 2-4C11 in the preincubation mixture of the recombined Beta2-toxin with PLC.

The established Capture-ELISA is a useful method for the quantitative determination of Beta2-toxin in *C. perfringens* culture supernatants under routine conditions.

**Literaturverzeichnis**

- Al-Khaldi, S. F., K. M. Myers, Rasooly, A., Chizhikov, V.** 2004. "Genotyping of *Clostridium perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization." Mol Cell Probes **18**(6): 359-67.
- Al-Khaldi, S. F., D. Villanueva, Chizhikov, V.** 2004. "Identification and characterization of *Clostridium perfringens* using single target DNA microarray chip." Int J Food Microbiol **91**(3): 289-96.
- Albini, S., I. Brodard, A. Jaussi, N. Wollschlaeger, J. Frey, R. Miserez, C. Abril.** 2008. "Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates." Vet Microbiol **127**(1-2): 179-85.
- Allaart, J. G., A. J. van Asten, Vernooij, J. C. M., Gröne, A.** 2011. "Effect of *Lactobacillus fermentum* on beta2 toxin production by *Clostridium perfringens*." Appl Environ Microbiol **77**(13): 4406-11.
- Allaart, J. G., A. J. A. M. van Asten, J. C. M. Vernooij, A. Gröne.** 2014. "Beta2 toxin is not involved in in vitro cell cytotoxicity caused by human and porcine cpb2-harboured *Clostridium perfringens*." Vet. Microbiol. **171**: 132-138.
- Altschul, S. F., W. Gish, Miller, W., Myers, E. W., Lipmann, D. J.** 1990. "Basic local alignment search tool." J Mol Biol. Oct 5; **215**(3): 403-10.
- Aschfalk, A. and W. Muller.** 2001. "Clostridium perfringens toxin types in hooded seals in the Greenland Sea, determined by PCR and ELISA." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **48**(10): 765-9.
- Aschfalk, A. and W. Muller.** 2002. "Clostridium perfringens toxin types from wild-caught Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), determined by PCR and ELISA." Can J Microbiol **48**(4): 365-8.
- Aschfalk, A., P. Valentin-Weigand, Muller, W., Goethe, R.** 2002. "Toxin types of *Clostridium perfringens* isolated from free-ranging, semi-domesticated reindeer in Norway." Vet Rec **151**(7): 210-3.
- Bacciarini, L. N., P. Boerlin, Straub, R., Frey, J., Gröne, A.** 2003. "Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* beta2-toxin in the gastrointestinal tract of horses." Vet Pathol **40**(4): 376-81.
- Bacciarini, L. N., Gröne, A., O. Pagan, Frey, J.** 2001. "Clostridium perfringens beta2-toxin in an African elephant (*Loxodonta africana*) with ulcerative enteritis." Vet Rec **149**(20): 618-20.
- Badagliacca, P., A. Di Provvido, A., Scattolini, S., Pompei, G., Di Giannatale, E.** 2010. "Toxin genotyping of *Clostridium perfringens* strains using a polymerase chain reaction protocol." Vet Ital **46**(1): 107-12, 113-8.
- Ba-Thein, W., M. Lyrstis, K. Ohtani, I. T. Nisbet, H. Hayashi, J. I. Rood and T. Shimizu.** 1996. "The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*." J Bacteriol. **178**(9): 2514-2520.
- Bradford, M. M.** 1976: "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254
- Booth, I. R.** 1985. "Regulation of cytoplasmic pH in bacteria." Microbiol Rev **49**(4): 359-78.
- Boujon, P., M. Henzi, Penseyres, J. H., Belloy, L.** 2005. "Enterotoxaemia involving beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in a white stork (*Ciconia ciconia*)." Vet Rec **156**(23): 746-7.



- Bueschel, D. M., B. H. Jost, Billington, S. J., Trinh, H. T., Songer, J. G. 2003. "Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in Clostridium perfringens field isolates: correlation of genotype with phenotype." Vet Microbiol **94**(2): 121-9.
- Cai, Y., J. Gao, Wang, X., Zhang, X., Duan, H., Jiang, S., Zucker, B.-A., Schlenker, G. 2008. "Clostridium perfringens toxin types from freshwater fishes in one water reservoir of Shandong Province of China, determined by PCR." Dtsch Tierarztl Wochenschr **115**(8): 292-4, 296-7.
- Carman, R. J., S. Sayeed, Jihong Li, Genheimer, C. W., Hiltonsmith, M. F., Wilkins T. D., McClane, B. A. 2008. "Clostridium perfringens toxin genotypes in the feces of healthy North Americans." Anaerobe **14**(2): 102-8.
- Chalmers, G., S. W. Martin, Hunter, D. B., Prescott, J. F., Weber, L.J., Boerlin, P. 2008. "Genetic diversity of Clostridium perfringens isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm." Vet Microbiol **127**(1-2): 116-27.
- Chen, J. and B. A. McClane. 2012. "The Role of the Agr-like Quorum Sensing System in Regulating Toxin Production by Clostridium perfringens Type B Strains CN1793 and CN1795." Infect Immun **80** (9): 3008-3017.
- Cooper, K. K., J. R. Theoret, Stewart, B. A., Trinh, H. T., Glock, R. D., Songer, J. G. 2010. "Virulence for chickens of Clostridium perfringens isolated from poultry and other sources." Anaerobe **16**(3): 289-92.
- Crespo, R., D. J. Fisher, Shivaprasad, H. L., Fernández-Miyakawa, M. E., Uzal, F. A. 2007. "Toxinotypes of Clostridium perfringens isolated from sick and healthy avian species." J Vet Diagn Invest **19**(3): 329-33.
- Czczulin, J. R., R. E. Collie, McClane, B. A. 1996. "Regulated expression of Clostridium perfringens enterotoxin in naturally cpe-negative type A, B, and C isolates of C. perfringens." Infect Immun **64**(8): 3301-9.
- Dennison, A. C., D. C. Van Metre, Morley, P. S., Callan, R. J., Plampin, E. C., Ellis, R. P. 2005. "Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in vivo production of major toxins by Clostridium perfringens obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum." J Am Vet Med Assoc **227**(1): 132-8.
- Dray, T. 2004. "Clostridium perfringens type A and beta2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat." Can Vet J **45**(3): 251-3.
- Engstrom, B. E., C. Fermér, Lindberg, A., Saarinen, E., Båverud, V., Gunnarsson, A. 2003. "Molecular typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry." Vet Microbiol **94**(3): 225-35.
- Esmay, P. A., S. J. Billington, M. A. Link, J. G. Songer and B. H. Jost. 2003. "The Arcanobacterium pyogenes collagen-binding protein, CbpA, promotes adhesion to host cells." Infect Immun **71** (8): 4368-4374.
- Farzan, A., J. Kircanski, J. Delay, G. Soltes, J. G. Songer, R. Friendship, J. F. Prescott. 2013. "An investigation into the association between cpb2-encoding Clostridium perfringens type A and diarrhea in neonatal piglets." The Canadian Journal of Veterinary Research **77**: 45-53.
- Ferrarezi, M. C., T. C. Cardoso, Dutra, I. S. 2008. "Genotyping of Clostridium perfringens isolated from calves with neonatal diarrhea." Anaerobe **14**(6): 328-31.
- Fisher, D. J. 2006. "Clostridium perfringens beta2 toxin: a potential accessory toxin in gastrointestinal diseases of humans and domestic animals." Thesis; University of Pittsburgh.
- Fisher, D. J., M. E. Fernandez-Miyakawa, Sayeed, S., Poon, R., Adams, V., Rood, J. I., Uzal, F. A., McClane, B. A. 2006. "Dissecting the contributions of Clostridium

- perfringens type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model." Infect Immun **74**(9): 5200-10.
- Fisher, D. J., K. Miyamoto, Harrison, B., Akimoto, S., Sarker, M. R., McClane, B. A.** 2005. "Association of beta2 toxin production with Clostridium perfringens type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene." Mol Microbiol **56**(3): 747-62.
- Garmory, H. S., N. Chanter, French, N. P., Bueschel, D., Songer, J.G., Titball, R. W.** 2000. "Occurrence of Clostridium perfringens beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays." Epidemiol Infect **124**(1): 61-7.
- Gentry, M. K., Dalrymple, J. M.** 1980. "Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin." J Clin Microbiol **12** (3): 361 – 6.
- Gholamiandekhordi, A. R., R. Ducatelle, Heydrickx, M., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F.** 2006. "Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from poultry flocks with different disease status." Vet Microbiol **113**(1-2): 143-52.
- Gibert, M., C. Jolivet-Reynaud, Popoff, M. R.** 1997. "Beta2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens." Gene **203**(1): 65-73.
- Gkiourtzidis, K., J. Frey, Bourtz-Hatzopoulou, E., Iliadis, N., Sarris, K.** 2001. "PCR detection and prevalence of alpha-, beta-, beta 2-, epsilon-, iota- and enterotoxin genes in Clostridium perfringens isolated from lambs with clostridial dysentery." Vet Microbiol **82**(1): 39-43.
- Gobeli, S., C. Berset, Burgener, I., Perreten, V.** 2012. "Antimicrobial susceptibility of canine Clostridium perfringens strains from Switzerland." Schweiz Arch Tierheilkd **154**(6): 247-50.
- Greco, G., A. Madio, Buonavoglia, D., Totaro, M., Corrente, M., Martella, V., Buonavoglia, C.** 2005a. "Clostridium perfringens toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy." Vet J **170**(3): 346-50.
- Greco, G., A. Madio, Martella, V., Campolo, M., Corrente, M., Buonavoglia, D., Buonavoglia, C.** 2005b. "Enterotoxemia associated with beta2 toxin-producing Clostridium perfringens type A in two Asiatic black bears (Selenarctos thibetanus)." J Vet Diagn Invest **17**(2): 186-9.
- Gurjar, A.** 2008. "Characterization of Clostridium perfringens Beta2 toxin." Department of Veterinary and Biomedical Sciences, Pennsylvania State University. ProQuest, Umi Dissertation Publishing.
- Gurjar, A., J. Li. McClane, B. A.** 2010. "Characterization of toxin plasmids in Clostridium perfringens type C isolates." Infect Immun **78**(11): 4860-9.
- Gurjar, A. A., N. V. Hegde, Love, B:C, Jayarao, B. M.** 2008. "Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of Clostridium perfringens toxin producing strains in feces of dairy cattle." Mol Cell Probes **22**(2): 90-5.
- Harrison, B., D. Raju, Garmory, H. S., Brett, M. M., Titball, R. W., Sarker, M. R.** 2005. "Molecular characterization of Clostridium perfringens isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin-encoding gene." Appl Environ Microbiol **71**(12): 8362-70.
- Hatheway, C. L.** 1990. "Toxigenic clostridia." Clin Microbiol Rev **3**(1): 66-98.
- Hazlett, M. J., J. Kircanski, Slavic, D., Prescott, J. F.** 2011. "Beta 2 toxigenic Clostridium perfringens type A colitis in a three-day-old foal." J Vet Diagn Invest **23**(2): 373-6.

- Herholz, C., R. Miserez, Nicolet, J., Frey, J., Popoff, M., Gibert, M., Gerber, H., Straub, R.** 1999. "Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders." J Clin Microbiol **37**(2): 358-61.
- Heydel, C.** 2010. Gentechnische Herstellung und Charakterisierung der Exotoxine Beta und Beta2 von *Clostridium perfringens*. IHIT. Veterinärmedizinische Dissertation, Giessen, Justus Liebig Universität, .
- Heydel, C.** 2012. Mündliche Mitteilung, Ergebnisse der Routinediagnostik des Instituts, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU-Giessen.
- Hubble, T. S., J. F. Hatton, S. R. Nallapareddy, B. E. Murray and M. J. Gillespie.** 2003. "Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin." Oral Microbiol Immunol. **18** (2): 121-126.
- Johansson, A., A. Aspan, Bagge, E., Båverud, V., Engström, B. E., Johansson, K. E.** 2006. "Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge." BMC Microbiol. **6**:47
- Johannsen, U., S. Menger, W. Erwerth and B. Kohler.** 1986. "[*Clostridium perfringens* type C enterotoxemia (necrotizing enteritis) in suckling pigs. 2. Light and electron microscopic studies of the pathology and pathogenesis of experimental *Clostridium perfringens* type C toxin poisoning]." Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin. **40** (6): 881-894.
- Johannsen, U., S. Menger, W. Erwerth and B. Kohler.** 1986. "[*Clostridium perfringens* type C enterotoxemia (necrotizing enteritis) of suckling pigs. 3. Light and electron microscopic studies of the pathology and pathogenesis of experimental *Clostridium perfringens* type C infection]." Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin. **40** (6): 895-909.
- Johannsen, U., P. Arnold, Köhler, B., Selbitz, H.J.** 1993. "Untersuchungen zur experimentellen *Clostridium perfringens*-Typ-A-Enterotoxämie der Saugferkel." Mh Vet- Med. **48**: 129- 136.
- Johannsen, U., Menger, S., P. Arnold, Köhler, B., Selbitz, H. J.** 1993. "Untersuchungen zur experimentellen *Clostridium perfringens*-Typ-A-Enterotoxämie der Saugferkel." Mh Vet- Med. **48**: 267- 273.
- Jolivet-Reynaud, C., M. Popoff, M.-A. Vinit, P. Ravisse, H. Moreau and J. E. Alouf.** 1986. "Enteropathogenicity of *Clostridium perfringens* Beta Toxin and Other Clostridial Toxins." Zbl. Bakteriol S **15**: 145- 151.
- Jores, J., A. E. Derocher, Staubach, C., Aschfalk, A.** 2008. "Occurrence and prevalence of *Clostridium perfringens* in polar bears from Svalbard, Norway." J Wildl Dis **44**(1): 155-8.
- Jost, B. H., S. J. Billington, Trinh, H. T., Bueschel, D. M., Songer, J. G.** 2005. "Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin." Infect Immun **73**(1): 652-6.
- Jost, B. H., H. T. Trinh and J. G. Songer.** 2006. "Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing." Vet Microbiol. **116** (1-3): 158-165.
- Kearny, J.-F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.** 1979. "A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines." J. Immunol **123** (4): 1548-1550.
- Kießling, A.** 2004. Untersuchungen über das Vorkommen und die Verbreitung von Beta2-Toxin-bildenden *Clostridium perfringens*-Stämmen mittels Mono- und Multiplex-PCR. Veterinärmedizinische Dissertation, Giessen, Justus-Liebig-Universität.

- Kircanski, J., Hodgins, D., Soltes, G., Pei, Y., Parreira, V. R., Songer, J. G., Prescott, J. F. 2012. "Development of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium perfringens* beta2-toxin in porcine feces and the neonatal piglet intestine." J Vet Diagn Invest **24**(5): 895-902.
- Klaasen, H. L., M. J. Molkenboer, Bakker, J., Miserez, R., Häni, H., Frey, J., Popoff, M. R., van den Bosch, J. F. 1999. "Detection of the  $\beta$ 2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland." FEMS Immunol Med Microbiol **24**(3): 325-32.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." J Biochem Biophys Methods **10**:203-9.
- Laemmli, U. K. 1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature. **227** (5259): 680-685.
- Lebrun, M., P. Filée, Galleni, M., Linden, A., Taminiau, B. 2007a. "Purification of the recombinant beta2 toxin (CPB2) from an enterotoxaemic bovine *Clostridium perfringens* strain and production of a specific immune serum." Protein Expr Purif **55**(1): 119-31.
- Lebrun, M., P. Filée, Mousset, B., Desmecht, D., Galleni, M., Mainil, J. G., Linden, A. 2007b. "The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome." Vet Microbiol **120**(1-2): 151-7.
- Li, J., J. Chen, Vidal, J. E., McClane, B. A. 2011. "The Agr-like quorum-sensing system regulates sporulation and production of enterotoxin and beta2 toxin by *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease strain F5603." Infect Immun **79**(6): 2451-9.
- Manteca, C., G. Daube, Jauniaux, T., Linden, A., Pirson, V., Detilleux, J., Ginter, A., Kaeckenbeeck, A., Mainil, J. G. 2002. "A role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia?" Vet Microbiol **86**(3): 191-202.
- Meer, R. R. and J. G. Songer. 1997. "Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*." Am J Vet Res **58**(7): 702-5.
- Miyamoto, K., D. J. Fisher, Li, J., Sayeed, S., Akimoto, S., McClane, B. A. 2006. "Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates." J Bacteriol **188**(4): 1585-98.
- Mueller-Spitz, S. R., L. B. Stewart, Klump, J. V., McLellan, S. L. 2010. "Freshwater suspended sediments and sewage are reservoirs for enterotoxin-positive *Clostridium perfringens*." Appl Environ Microbiol **76**(16): 5556-62.
- Nagahama, M., S. Hayashi, Morimitsu, S., Sakurai, J. 2003. "Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells." J Biol Chem **278**(38): 36934-41.
- Nikolaou, G. N., M. J. Kik, van Asten, A. J. A. M., Gröne, A. 2009. "Beta2-toxin of *Clostridium perfringens* in a hamadryas baboon (*Papio hamadryas*) with enteritis." J Zoo Wildl Med **40**(4): 806-8.
- Nowell, V. J., A. M. Kropinski, Songer, J. G., MacInnes, J. I., Parreira, V. R., Prescott, J. F. 2012. "Genome Sequencing and Analysis of a Type A *Clostridium perfringens* Isolate from a Case of Bovine Clostridial Abomasitis." PLoS One **7**(3): e32271.
- Ohtani, K., H. I. Kawsar, Okumura, O., Hayashi, H., Shimizu, T. 2003. "The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in *Clostridium perfringens* strain 13." FEMS Microbiol Lett **222**(1): 137-41.

- Petit, L., M. Gibert, Popoff, M. R. 1999. "Clostridium perfringens: toxinotype and genotype." Trends Microbiol 7(3): 104-10.
- Prince, W.S., Harder K.J., Saks, S., Reed, B. R., Chen, A. B., Joens, A. J. S. 1987: "ELISA for quantitation of tumor necrosis factor-alpha in serum". J Pharm. Biomed. Anal. 5 (8): 793-802
- Rood, J. I., S. T. Cole. 1991. "Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens." Microbiol Rev 55(4): 621-48.
- Roskens, D. H. 2008. A study of the beta-2 toxin gene and the beta-2 toxin in Clostridium perfringens strains isolated from human sources. Ph.D., Department of Pathology and Laboratory Medicine, Indiana University.
- Sakurai, J., C. L. Duncan. 1978. "Some properties of beta-toxin produced by Clostridium perfringens type C." Infect Immun 21(2): 678-80.
- Sakurai, J., S. Ochi, H. Tanaka. 1993. "Evidence for coupling of Clostridium perfringens alphatoxin-induced hemolysis to stimulated Phosphatidic acid formation in rabbit erythrocytes." Infect. Immun. 61 (9): 3711 – 3718.
- Selbitz, H. J., Schoepe, H., Springer, S., Neubauer, A., Rösch, H. 2000. Die Immunprophylaxe der Clostridiosen des Saugferkels. Tierärztl Prax. 28 (G): 337- 340.
- Sengupta, N., S. I. Alam, Kumar, R. B., Singh, L. 2011. "Diversity and antibiotic susceptibility pattern of cultivable anaerobic bacteria from soil and sewage samples of India." Infect Genet Evol 11(1): 64-77.
- Shatursky, O., R. Bayles, Rogers, M., Jost, B. H., Songer, K. G. Tweten, R. K. 2000. "Clostridium perfringens beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers." Infect Immun 68(10): 5546-51.
- Shimizu, T., K. Ohtani, Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., Hayashi, H. 2002. "Complete genome sequence of Clostridium perfringens, an anaerobic flesh-eater." Proc Natl Acad Sci U S A 99(2): 996-1001.
- Shivaprasad, H. L., F. Uzal, Kokka, R., Fisher, D. J., McClane, B. A., Songer, A. G. 2008. "Ulcerative enteritis-like disease associated with Clostridium perfringens type A in bobwhite quail (Colinus virginianus)." Avian Dis 52(4): 635-40.
- Shome, B. R., R. Shome, Bujarbaruah, K. M., Das, A., Rahman, H., Sharma, G. D., Dutta, B. K. 2010. "Investigation of haemorrhagic enteritis in pygmy hogs (Sus salvanus) from India." Rev Sci Tech 29(3): 687-93.
- Siragusa, G. R., M. D. Danyluk, Hiett, K. L., Wise, M. G., Cravenb, S. E. 2006. "Molecular subtyping of poultry-associated type A Clostridium perfringens isolates by repetitive-element PCR." J Clin Microbiol 44(3): 1065-73.
- Songer, J. G. 1996. "Clostridial enteric diseases of domestic animals." Clin Microbiol Rev 9(2): 216-34.
- Springer, S, Finzel, J., Florian, V., Schoepe, H., Weitow, G., Selbitz, H.-J. 2012. "Vorkommen und Bekämpfung des Clostridium-perfringens-Typ-A-assoziierten Durchfalls der Saugferkel unter besonderer Berücksichtigung der Immunprophylaxe." Tierärztl Prax 40 (G): 375-382
- Sting, R. 2009. "Detection of beta2 and major toxin genes by PCR in Clostridium perfringens field isolates of domestic animals suffering from enteritis or enterotoxaemia." Berl Munch Tierärztl Wochenschr 122(9-10): 341-7.
- Tada, H., Shibo, O., Kuroshima, K., Koyama, M. Tsukamoto, K. 1986. "An improved colorimetric assay for interleukin-2." J Immunol Methods 93: 157 – 165.
- Thiede, S., R. Goethe, Amtsberg, G. 2001. "Prevalence of beta2 toxin gene of Clostridium perfringens type A from diarrhoeic dogs." Vet Rec 149(9): 273-4.

- Thompson, D. R., V. R. Parreira, Kulkarni, R. R., Prescott, J. F.** 2006. "Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens." Vet Microbiol **113**(1-2): 25-34.
- Timoney, J. F., M. Hartmann, Fallon, L., Fallon, E., Walker, J.** 2005. "Antibody responses of mares to prepartum vaccination with *Clostridium perfringens* bacterin and beta2 toxin." Vet Rec **157**(25): 810-2.
- Uzal, F. A., D. J. Fisher, Saputo, J., Sayeed, S., McClane, B. A., Songer, G., Trinh, H. T., Miyakawa, F. M. E., Gard, S.** 2008. "Ulcerative enterocolitis in two goats associated with enterotoxin- and beta2 toxin-positive *Clostridium perfringens* type D." J Vet Diagn Invest **20**(5): 668-72.
- van Asten, A. J., J. G. Allaart, Meeles, A. D., Gloudemanns, P. W. J. M., Houwers, D. J., Gröne, A.** 2008. "A new PCR followed by MboI digestion for the detection of all variants of the *Clostridium perfringens* cpb2 gene." Vet Microbiol **127**(3-4): 412-6.
- van Asten, A. J., G. N. Nikolaou, Gröne, A.** 2010. "The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans." Vet J **183**(2): 135-40.
- Vidal, J. E., B. A. McClane, Saputo, J., Parker, J., Uzal, F.A.** 2008. "Effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the rabbit small intestine and colon." Infect Immun **76**(10): 4396-404.
- Vidal, J. E., K. Ohtani, Shimizu, T., McClane, B. A.** 2009. "Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates." Cell Microbiol **11**(9): 1306-28.
- Vilei, E. M., Y. Schlatter, Perreten, V., Straub, R., Popoff, M. R., Gibert, M. Gröne, A., Frey, J.** 2005. "Antibiotic-induced expression of a cryptic cpb2 gene in equine beta2-toxigenic *Clostridium perfringens*." Mol Microbiol **57**(6): 1570-81.
- Waters, M., D. Raju, Garmory, H. S., Popoff, M. R., Sarker, M. R.** 2005. "Regulated expression of the beta2-toxin gene (cpb2) in *Clostridium perfringens* type A isolates from horses with gastrointestinal diseases." J Clin Microbiol **43**(8): 4002-9.
- Waters, M., A. Savoie, Garmory, H. S., Bueschel, D., Popof, M. R., Songer, J. G., Titball, R. W., McClane, B. A., Sarker, M. R.** 2003. "Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets." J Clin Microbiol **41**(8): 3584-91.
- Xu, Y., J. M. Rivas, E. L. Brown, X. Liang, M. Hook.** 2004. "Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen." J Infect Dis **189** (12): 2323-2333.
- Zeng, J., G. Deng, Wang, j., Zhou, J., Liu, X., Xie, Q., Wang, Y.** 2011. "Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* alpha-beta2-beta1 fusion toxin in mice, sows and cows." Vaccine **29**(33): 5459-66.

## 9 ANHANG

### 9.1 Chemikalien

Anorganische und organische Reagenzien wurden bezogen von Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen).

### 9.2 Antikörperkonjugate

Antikörperkonjugate wurden von Amersham (Braunschweig) bezogen.

### 9.3 Plasmide

pASK-IBA2	Amp <sup>r</sup>	Institut für Bioanalytik, Göttingen
-----------	------------------	-------------------------------------

### 9.4 Versuchstiere

Balb/c-Mäuse	Fa. Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon
Weißer Neuseeländer-Kaninchen	Fa. Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon

### 9.5 Kulturmedien

Blutagar

Blutagarbasis	50 g
Schafschüttelblut	50 ml
A. bidest	ad 1000 ml
Das Schafblut nach dem Autoklavieren bei 50°C zugeben	

Clostridium perfringens –Medium 1 (CPM1)

Grundmedium (NBI)	25 g
Stärke	1 g
Hefeextrakt	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
Cysteinhydrochlorid	0,5 g
Glukose	4 g
Cellobiose	1 g
A. bidest	ad 1000 ml

Mediumgefäße werden mit Leberstückchen belegt, autoklaviert und anschließend wird das Medium unter sterilen Bedingungen hinzugefügt.

#### Leberbouillon nach Tarozzi

Standard I-Nährbouillon	12,5 g
Rinderleber	2-3 Stückchen/10 ml
Agar-Agar	0,1 %
A. bidest	ad 1000 ml

#### Eigelblaktoseagar

Laktose	1 g
Bromkresolpurpurlösung 0,4%	1 ml
Eigelb	15-20 ml
NaCl-Lösung 0,85%	15-20 ml

#### Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar-Agar	20 g
A. bidest	ad 1000 ml

#### Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
A. bidest	ad 1000 ml

#### Zeissleragar

Columbiaagar	52 g
Glucose	10 g
Blut	ca. 50 ml
A. bidest	ad 1000 ml



## 9.6 Puffer und Lösungen

### 9.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese Puffer

#### Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung

Coomassie-Brilliantblau	100 ml
Eisessig	10 ml
Methanol	40 ml
A. bidest	50 ml

#### Coomassie-Entfärber

Eisessig	10 ml
Methanol	40 ml
A. bidest	50 ml

#### Elektrophoreselaufpuffer

Tris	3,03 g
Glycin	14,40 g
SDS	1,00 g
A. bidest	ad 1000 ml

#### Probenpuffer nach LAEMMLI

Bromphenolblau	0,05 g
SDS	23,00 g
Glyzerol	100,00 g
Tris	7,50 g
A. bidest	ad 1000 ml
pH 6,8 einstellen mit 37% HCl	

#### Sammelgelpuffer (1 M, pH 8,9)

Tris	121,14 g
A. bidest	ad 1000 ml
pH-Wert einstellen mit 37% HCl	

Trenngelpuffer (1,5 M, pH 8,8)

Tris	181,71 g
A. bidest	ad 1000 ml
pH-Wert einstellen mit 37% HCl	

**9.6.2 Puffer für den Elektrotransfer mittels Western-Blot-Verfahren**

Anodenpuffer I

1 M Tris	300 ml
Methanol	200 ml
A. bidest	500 ml

Anodenpuffer II

1 M Tris	25 ml
Methanol	200 ml
A. bidest	770 ml

Kathodenpuffer

1 M Tris	25 ml
Epsilon-Aminocaprinsäure	5,25 g
Methanol	200 ml
A. bidest	770 ml

Tris-Lösung (1 M, pH 9,0)

Tris	121,14 g
A. bidest	ad 1000 ml

**9.6.3 Puffer und Lösungen für den Immunoblot**

PBS-Stammlösung (10-fach)

NaCl	100,00 g
KCl	2,50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,50 g

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	18,00 g
A. bidest	ad 1000 ml
pH-Wert der Gebrauchslösung mittels 37% HCl bzw. gesättigter NaOH einstellen	

#### PBS-Tween

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,94 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00 g
NaCl	16,36 g
Tween 20 <sup>®</sup>	1,00 ml
Aqua bidest	ad 2000 ml
pH-Wert einstellen mittels 37% HCl bzw. gesättigter NaOH	

#### Substratlösung für den Immunoblot

4-Chlor-1-Naphtol	3 mg
Methanol	1 ml

#### Substratgebrauchslösung für den Immunoblot

Stammlösung	2 ml
1 x PBS, pH 7,4	8 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7 µl

### 9.6.4 Puffer für die Induktion, Expression und Aufreinigung des Beta2-Toxins

#### Periplasmapuffer P

Tris-HCl	100 mM
Saccharose	500 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0 einstellen mit HCl	

#### Waschpuffer W

Tris-HCl	100 mM
pH 8,0 einstellen mit HCl	

Elutionspuffer

Tris-HCl	100 mM
Desthiobiotin	2,5 mM

Regenerationspuffer

Tris-HCl	100 mM
HABA (4-hydroxybenzen-2-carboxylsäure)	1 mM

### 9.6.5 Puffer und Lösungen für den ELISA

Coating-Puffer Stammlösung A

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	21,20 g
A. bidest	ad 1000 ml

Coating-Puffer Stammlösung B

$\text{NaHCO}_3$	16,80 g
A. bidest	ad 1000 ml

Gebrauchslösung Coating-Puffer

Stammlösung A	17,00 ml
Stammlösung B	8,00 ml
A. bidest	ad 100 ml

Substratpuffer

Zitronensäure x 1 $\text{H}_2\text{O}$	4,67 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ x 2 $\text{H}_2\text{O}$	10,18 g
A. bidest	ad 1000 ml

Substratlösung

ortho-Phenylendiamin	5 mg
$\text{H}_2\text{O}_2$	3 $\mu\text{l}$
Substratpuffer	10 ml

### 9.6.6 Puffer für Hämolyseversuche

#### Natrium-Citrat-Lösung

Na-Citrat	3,8 g
A. bidest	100 ml

#### Isotoner Waschpuffer (IWP)

NaCl	135,00 mM
NaHCO <sub>3</sub>	11,90 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,36 mM
Dextrose	5,00 mM
KCl	1,50 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,98 mM
Hepes	4,60 mM

pH-Wert einstellen mit HCl

#### Hypotoner Waschpuffer (HWP)

NaHCO <sub>3</sub>	11,90 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,36 mM
Dextrose	5,00 mM
KCl	1,50 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,98 mM
Hepes	4,60 mM

pH-Wert 7,2 einstellen mit HCl

### 9.6.7 Puffer und Lösungen für Zellkulturtechniken

#### MTT-Stammlösung (5mg/ml)

MTT	0,5 g
PBS	100 ml

PBS-EDTA-Puffer(pH 7,4)

PBS-EDTA-Stammlösung	100 ml
A. bidest	ad 1000 ml

PBS-EDTA-Stammlösung (10-fach, pH 7,4)

NaCl	80,00 g
KCl	2,00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	14,20 g
Na-EDTA x 2H <sub>2</sub> O	20,00 g
A. bidest	ad 1000 ml

Trypanblau-Lösung

Trypanblau	0,20 g
NaCl-Lösung	1000 ml

Zellkulturmedium 1

RPMI 1640	880 ml
FCS	100 ml
Penicillin (10.000 IE/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml)-Lösung	10 ml
Glutamin (200 mM)	10 ml

## 9.7 Injektionsnarkotikum

Avertin<sup>R</sup>

2,2,2 Tribrommethanol	2 g
tertiärer Amylalkohol	2 ml
A. bidest	ad 100 ml

### Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. habil. em. Georg Baljer, für die Vergabe des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz, das angenehme Arbeitsklima, die stetige Hilfsbereitschaft während der Erstellung dieser Arbeit und das vorhandene Vertrauen ganz besonders bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Heike Schoepe, die nie die Hoffnung aufgab, mit mir unermüdlich kämpfte und mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich mich bei der damaligen Clostridien-Arbeitsgruppe (Annette Baisch, Sabine Grölz-Krug, Carsten Heydel) für den immer gegenwärtigen Rückhalt bedanken. Wir waren ein tolles Team!

Herrn Prof. Dr. Hermann Willems danke ich sehr für die Herstellung des rekombinanten Beta2-Toxins, der Basis dieser Doktorarbeit.

Dank auch an Herrn Dr. Christian Menge und Frau Dr. Ivonne Stamm für ihre Hilfe bei den zytologischen Untersuchungen und Ihre Unterstützung.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes, hier vor allem der gesamten Diagnostik, den „Spülküchen-Damen“ und den Damen vom S2-Labor, danke ich für das tolle Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft.

Dem „ehemaligen Doktorandenzimmer“ sei Dank! Euch möchte ich für den Spaß, die Gemeinsamkeit, den rat- und tatkräftigen Beistand und die Hoffnung, doch irgendwann Doktor zu werden, herzlich danken.

Herrn Dr. Reinhard Weiß möchte ich ganz herzlich danken. Er war immer da, wenn ich Hilfe bei der einen oder anderen Umsetzung brauchte.

Frau Dr. Stefanie Bohle und Herrn Timo Meier möchte ich für die stetige Unterstützung in der Formatierung und für die nie schwinde Hoffnung ganz besonders danken.

Den Impfstoffwerken Dessau-Tornau GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Ich möchte auch all meinen Freunden von Herzen für „Euer Dasein“, während der gesamten Zeit und ganz besonders in den letzten Jahren, danken! Was wäre ein Leben ohne Freunde und vor allem ohne Euch!

Natürlich danke ich meinen ehemaligen Arbeitgebern dem gesamten Praxisteam *Dres. Haan* und *VetConcept*, hier besonders meinem geliebten Außendienst-Team, und meinem neuen Wirkungsort im Allgäu *almapharm* für die Bereitstellung von Zeit, das Rückenstärken und den nie aufhörenden Glauben, dass ich einmal diese zwei Buchstaben tragen werde.

Mein größter und herzlichster Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern und Schwestern. Leider hat mein Vater das Ende meines „Lebenswerks“ nicht mehr miterlebt, aber ich weiß ganz genau, dass er immer sehr stolz auf mich war, nie aufgehört hat an mich zu glauben und auch jetzt von irgendwo dabei ist, zuschaut und sich mit mir freut.

Ohne Euch wäre ich nicht dort, wo ich bin und dieses Stück Papier wäre immer noch weiß und leer!

**DANKE**





*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFENBERGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6356-6



9 78 17 3 8 3 5 19 6 3 5 6 6